

Université de Montréal

L'effet du ligand du CD36 MPE-001 dans la protection de l'épithélium pigmentaire rétinien contre le stress oxydatif

par Marie-France Dorion

Mémoire présentée
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Août 2019

© Marie-France Dorion, 2019

Résumé

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est l'une des principales causes de la perte de vision chez les personnes âgées. Dans la DMLA de forme sèche, le stress oxydatif, l'inflammation et la dysfonction lipidique causent la perte des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) qui sont essentielles au maintien des photorécepteurs. Nous avons précédemment démontré qu'un ligand sélectif du CD36 permet de préserver la fonction rétinienne dans un modèle murin de la DMLA. Cependant, l'effet des ligands synthétiques du CD36 dans la protection du RPE n'a jamais été vérifié. L'objectif de cette étude était de caractériser l'effet cytoprotecteur du ligand du CD36 MPE-001 sur le RPE contre le stress oxydatif.

Le stress oxydatif a été induit chez la lignée humaine hTERT RPE-1 par le NaIO_3 . Il a été observé que le MPE-001 diminue la production de superoxydes mitochondriaux et l'apoptose des cellules du RPE sans toutefois affecter le système antioxydant au niveau transcriptionnel. Des essais par immunobuvardage et par immunocytochimie ont montré que le NaIO_3 perturbe le flux autophagique, alors que le MPE-001 le rétablit. L'effet protecteur du MPE-001 était complètement aboli par les inhibiteurs de l'autophagie wortmannin et bafilomycine A1. En conclusion, nous avons démontré pour la première fois qu'un ligand du CD36 protège les cellules du RPE contre le stress oxydatif de façon autophagie-dépendante. Nous proposons la modulation du stress oxydatif chez le RPE par l'activation du CD36 comme stratégie potentielle pour traiter la DMLA de forme sèche.

Mots-clés : dégénérescence maculaire liée à l'âge, CD36, épithélium pigmentaire rétinien, stress oxydatif, autophagie

Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of irreversible blindness in the elderly population. The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of epithelial cells that are critical in maintaining retinal neurons. Oxidative stress, inflammation and defects in lipid clearance are thought to cause damages to the RPE and the eventual loss of photoreceptors in the dry form of AMD. CD36 is a scavenger receptor that plays an important role in inflammation and lipid homeostasis. We have previously shown that stimulation of CD36 by a selective ligand preserves photoreceptor function in high fat high cholesterol diet-fed *ApoE*^{-/-} mice, a mouse model of AMD. The effect of CD36 ligands on RPE cells protection from oxidative insults, however, had yet to be investigated. In this study, we aimed to study the cytoprotective effect of the CD36 ligand MPE-001 in RPE cells exposed to oxidative stress.

Oxidative stress was induced in the human RPE cell line hTERT RPE-1 using NaIO₃. MPE-001 was observed to decrease NaIO₃-induced mitochondrial superoxide production and apoptosis, with no transcriptional effect on antioxidant enzymes. Immunoblotting and immunostaining showed that NaIO₃ disrupts autophagic flux while MPE-001 co-treatment restores it. The protective effect of MPE-001 was completely abolished by the autophagy inhibitors wortmannin and bafilomycin A1. In conclusion, we report for the first time that a CD36 ligand confers protection to RPE cells under oxidative stress through the improvement of autophagic process. We therefore propose modulation of oxidative stress by CD36 ligands as a potential strategy to treat dry AMD.

Keywords : age-related macular degeneration, CD36, retinal pigment epithelium, oxidative stress, autophagy

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements	xii
1. Revue de littérature	1
1.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	1
1.1.1. La macula	1
1.1.2. Le RPE et son rôle dans l'homéostasie rétinienne.....	3
1.1.3. Ses facteurs de risque.....	6
1.1.4. Sa définition et sa classification	8
1.1.4.1. La forme humide	9
1.1.4.2. L'atrophie géographique.....	10
1.1.5. La pathogenèse de la DMLA de forme sèche	11
1.1.5.1. Les changements cellulaires associés à l'âge	11
1.1.5.2. Le stress oxydatif	12
1.1.5.3. L'inflammation	14
1.1.5.4. La dysfonction lipidique	17
1.1.5.5. La dysfonction mitochondriale	18
1.1.5.6. La dysfonction autophagique.....	19
1.1.6. Les modèles <i>in vitro</i> des dommages oxydatifs causés au RPE	21
1.1.7. Les modèles précliniques de la DMLA de forme sèche	22
1.1.8. Les stratégies thérapeutiques actuelles de la préservation du RPE et des photorécepteurs	25
1.2. Le CD36.....	25

1.2.1.	Le CD36, un récepteur multiligand	26
1.2.2.	Les fonctions physiologiques du CD36	28
1.2.2.1.	Le métabolisme lipidique et la balance énergétique.....	29
1.2.2.2.	L'inflammation	30
1.2.2.3.	L'angiogenèse.....	31
1.2.3.	Le rôle du CD36 chez le RPE.....	31
1.3	Les ligands sélectifs du CD36 analogues du GHRP-6	33
1.3.1.	Des GHRPs aux azapeptides	33
1.3.2.	Le potentiel thérapeutique des ligands du CD36 dans la DMLA : les évidences actuelles	35
2.	Hypothèse de travail et objectifs.....	38
	Hypothèse	38
	Objectifs	38
3.	Manuscrit	39
	Abstract	39
	Introduction	40
	Materials and methods	42
	Results	47
	Discussion.....	53
	Conclusion	56
	References	57
	Table.....	61
	Figures.....	62
	Figure legends.....	73
4.	Discussion.....	76
5.	Perspectives	80
6.	Conclusion	81
	Bibliographie	82
	Annexe 1. Curriculum Vitae.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1. 19 gènes affectant le risque de développer la DMLA	7
Tableau 2. Modèles murins de la DMLA de forme sèche.....	24

Liste des figures

Figure 1. L'organe sensorielle visuelle	3
Figure 2. Structure du RPE.....	5
Figure 3. Un aperçu de la macroautophagie	20
Figure 4. Représentation schématique de la topologie putative du CD36 et des modifications post-traductionnelles connues	28
Figure 5 : Structure du MPE-001.....	35

Liste des abréviations

4-HNE : 4-hydroxynonénal
A2E : N-rétinyl-N-rétinylidène éthanolamine
ABCA1 : *ATP-binding cassette subfamily A member 1*
ABCG1 : *ATP-binding cassette subfamily G member 1*
ADAMTS9 : *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9*
ADN : acide désoxyribonucléique
AGE : produit de glycation avancé
APOB100 : apolipoprotéine B100
APOE : apolipoprotéine E
ARMS2 : *age-related maculopathy susceptibility 2*
ARNm : acide ribonucléique messager
ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
ATG5 : *autophagy-related 5*
ATG7 : *autophagy-related 7*
ATP : adenosine triphosphate
B3GALTL : *beta 3-glucosyltransferase*
BEST1 : *bestrophin-1*
BlamD : dépôt laminaire basal
BlinD : dépôt linéaire basal
CCCP : carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone
CCL2 : *C-C motif chemokine ligand 2*
CCR2 : *C-C motif chemokine receptor 2*
CD36 : *cluster of differentiation 36*
CD5L : *CD5 molecule like*
CEP : carboxyéthylpyrrole
CETP : *cholesteryl ester transfer protein*
CFB : *complement factor B*
CFH : *complement factor H*
CFI : *complement factor I*
COL10A1 : *collagen type X alpha 1 chain*
COL8A1 : *collagen type VIII alpha 1 chain*
CX3CR1 : *C-X3-C motif chemokine receptor 1*
DAMP : *danger-associated molecular pattern*
DDR1 : *discoidin domain receptor tyrosine kinase 1*
DHA : acide docosahexaénoïque
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
ER : réticulum endoplasmique
FAT : *fatty acid translocase*
FGF2 : *fibroblast growth factor 2*
FILIP1L : *filamin A interacting protein 1 like*
GCLM : *glutamate-cysteine ligase modifier subunit*
GHRP : *growth hormone-releasing peptide*
GHS-R1a : *growth hormone secretagogue receptor type 1a*

HDL : lipoprotéine de haute densité
 HMOX1 : *heme oxygenase 1*
 hTERT : *telomerase reverse transcriptase* humain
 HTRA1 : *HtrA serine peptidase 1*
 IBA1 : *ionized calcium-binding adapter molecule 1*
 IER3 : *immediate early response 3*
 IgM : immunoglobuline M
 IL-10 : *interleukin-10*
 IL-18 : *interleukin-18*
 IL-1 β : *interleukin-1beta*
 LC3B : *microtubule-associated protein light chain 3B*
 LDLox : lipoprotéine de basse densité oxydée
 LDLR : *low density lipoprotein receptor*
 LIMP2 : *lysosomal integral membrane protein-2*
 LIPC : *lipase C, hepatic type*
 LXR α : *Liver X receptor alpha*
 MCD : *mutated cathepsin D*
 MDA : malondialdéhyde
 MerTK : *Mer tyrosine kinase*
 MHC : *major histocompatibility complex*
 MIR548A2 : *microRNA 548a-2*
 NFE2L2 : *nuclear factor erythroid 2 like 2*
 NLRP3 : *nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3*
 NQO1 : *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1*
 PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*
 PEGF : *pigment epithelial growth factor*
 PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*
 PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*
 POS : segments externes des photorécepteurs
 PTGS2 : *prostaglandin endoperoxide synthase 2*
 RAD51B : *RAD51 paralog B*
 RB1CC1 : *RB1 inducible coiled-coil 1*
 R-FSL 1 : *(R)-fibroblast-stimulating lipopeptide 1*
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RPE : épithélium pigmentaire rétinien
 rtTA : *reverse tetracycline-dependent transactivator*
 SCL16A8 : *solute carrier family 16 member 8*
 SHR : Rat hypertensif spontané
 SOD1 : *superoxide dismutase 1*
 SOD2 : *superoxide dismutase 2*
 SR-B1 : *Scavenger receptor class B type 1*
 STX17 : *syntaxin-17*
 TGF- β : *transforming growth factor beta*
 TGFBR1 : *transforming growth factor beta receptor 1*

TIMP3 : *tissue inhibitor of metalloproteinase 3*

TLR : *toll-like receptor*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

TNFRSF10A : *TNF receptor superfamily member 10a*

TSP-1 : *thrombospondine-1*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

À tous ceux et celles qui m'ont aidé à réaliser mon projet de recherche

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Huy Ong, qui m'a accueilli dans son laboratoire de recherche en tant qu'étudiante à la maîtrise. J'aimerais également remercier les membres du laboratoire Katia Mellal et Mukandila Mulumba pour les connaissances et les techniques qu'ils m'ont appris tout au long de ma formation.

Un grand merci à mon collaborateur Dr Ken Itoh et ses collègues qui m'ont accueilli dans leur laboratoire à l'Université de Hirosaki, au Japon, pour deux séjours de recherche. Sans leurs expertises, mon projet de recherche ne se serait pas réalisé. J'aimerais remercier en particulier Shuya Kasai pour son aide et pour les événements qu'il a organisés pour m'intégrer dans leur équipe durant mes séjours de recherche.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers les Instituts de recherche en santé du Canada, le Japan Society for the Promotion of Science, Mitacs Globalink et les Fonds de recherche du Québec - Santé pour les soutiens financiers qu'ils m'ont offerts.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements constants.

1. Revue de littérature

1.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une pathologie dégénérative de la macula, la région de la rétine responsable de l'acuité visuelle (1). Elle représente l'une des principales causes de la perte de vision chez les personnes âgées (2). Tandis que les patients ne présentent que très peu de symptômes dans les phases précoces et intermédiaires, les phases avancées sont caractérisées par une perte de vision centrale irréversible. Les symptômes incluent une vision centrale brouillée, une sensation d'assombrissement de la vision, une déformation visuelle (métamorphopsie; surtout des lignes droites ou de textes), la perception d'une tache noire ou grise au centre de la vision (scotome) et de la difficulté à distinguer les détails (3). La qualité de vie des patients âgés, incluant leur niveau d'activité physique (4, 5) et leur état psychologique (6, 7), est grandement affectée. L'âge étant le plus grand facteur de risque de la DMLA, il est estimé que sa prévalence et son fardeau social et économique vont augmenter avec le vieillissement de la population. Mondialement, on anticipe que la DMLA affectera 288 millions de personnes en 2040 (8). L'impact négatif annuel de cette pathologie sur le produit intérieur brut du Canada était déjà estimé à 2,6 milliards de dollars en 2005 (9). La DMLA de forme sèche, la forme la plus courante de la maladie, n'a aucun traitement pharmacologique efficace à l'heure actuelle (1, 10). Un traitement qui peut prévenir, ralentir la progression ou la renverser aurait un bénéfice énorme, tant à l'individu qu'à la société.

1.1.1. La macula

La rétine est le tissu à l'arrière de l'œil responsable de la conversion de la lumière en signaux neuraux (10). Une représentation schématique de la structure de la rétine et sa micrographie sont présentées à la figure 1. Elle est composée de trois couches nucléaires contenant les somas des cellules nerveuses, séparées de deux couches plexiformes (externes et internes) qui sont les sites de synapses. Les somas des photorécepteurs se situent dans la couche

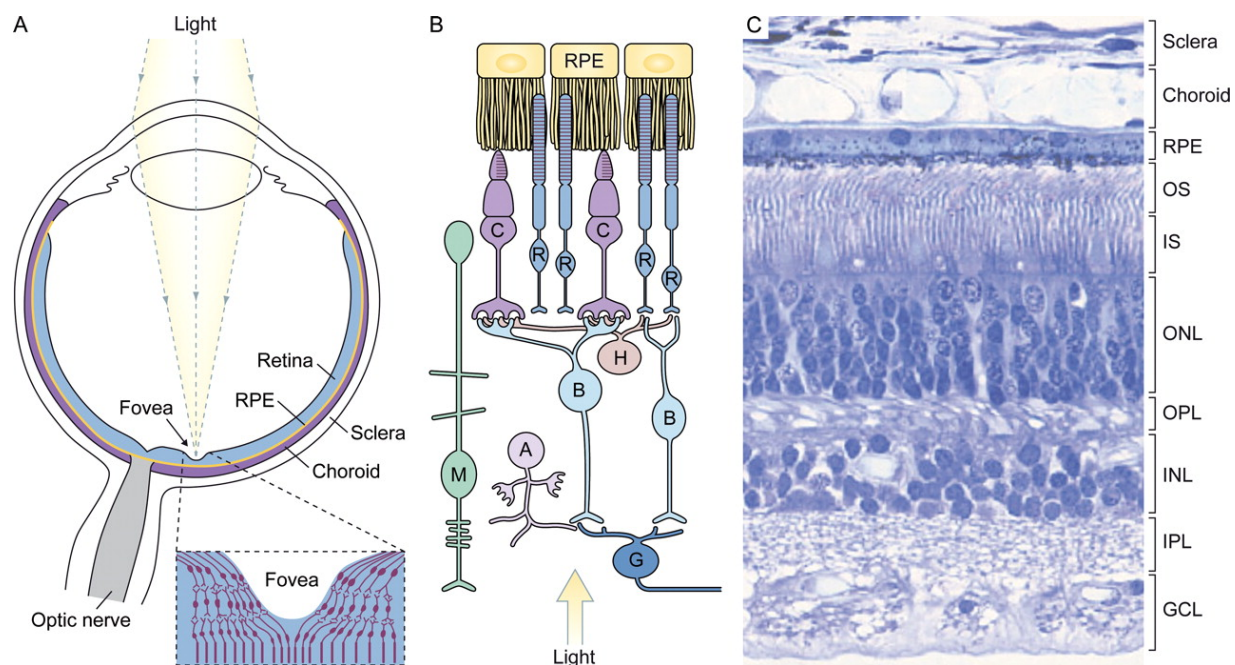
nucléaire externe. La couche nucléaire interne contient les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales et amacrines. Enfin, la couche de cellules ganglionnaires contient les cellules ganglionnaires et des cellules amacrines. Les axones des cellules ganglionnaires se rejoignent pour former le nerf optique. Les cellules de Müller, les cellules gliales de la rétine, s'étendent à la verticale sur toutes les couches de la rétine. Les photons traversent la rétine jusqu'aux segments externes des photorécepteurs (POS), où la transduction a lieu : ils sont absorbés par les opsines, pigments visuels des photorécepteurs, traduits en message biochimique, puis en message électrique (11, 12).

Il y a deux sources d'apport sanguin dans la rétine : l'artère rétinienne centrale et la choroïde. Les couches externes de la rétine dépendent des choriocapillaires pour se nourrir, alors que les couches internes sont nourries par les capillaires qui dérivent de l'artère rétinienne (11, 12). La choroïde reçoit 65-85% du débit sanguin (11). En fait, la choroïde a le plus grand débit sanguin par volume de tissu perfusé au niveau corporel (13).

La membrane de Bruch est une matrice de cinq couches qui se situe entre l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et la choroïde. C'est une barrière semi-perméable à travers laquelle des échanges métaboliques ont lieu. Elle est composée de la membrane basale des cellules du RPE, la zone de collagène interne, la zone élastique, la zone de collagène externe et la membrane basale des choriocapillaires (12, 14).

La macula ou macula lutea correspond à la région centrale de la rétine chez l'humain, proche du nerf optique, et est responsable de l'acuité visuelle et de la vision centrale (3, 14). Elle a une pigmentation jaune due aux caroténoïdes zéaxanthine et lutéine (15). La fovéa au centre de la macula contient la plus grande densité de photorécepteurs de la rétine et exclusivement des cônes (16, 17). Cette grande densité de photorécepteurs et la dominance des cônes par rapport aux bâtonnets permettent une vision centrale de haute résolution, c'est-à-dire qu'elles nous permettent de lire, de reconnaître les visages et de faire diverses tâches fines et détaillées (11). La région maculaire ne représente que 4 % de l'aire de la rétine, avec la fovéa mesurant seulement 1.5 mm de diamètre, mais elle est très importante pour notre capacité visuelle (18, 19).

Figure 1. L'organe sensoriel visuel



(A) Représentation schématique de l'œil, avec un agrandissement de la région fovéale. (B) Représentation schématique de la neurorétine. A, cellules amacrines, B, cellules bipolaires, C, cônes, G, cellules ganglionnaires, M, cellules de Müller, R, bâtonnets, RPE, épithélium pigmentaire rétinien. (C) Micrographe d'une coupe verticale de la rétine. OS, segment externe, IS, segment interne, ONL, couche nucléaire externe, OPL, couche plexiforme externe, INL, couche nucléaire interne, IPL, couche plexiforme interne, GCL, couche de cellules ganglionnaires. Tirée de (20).

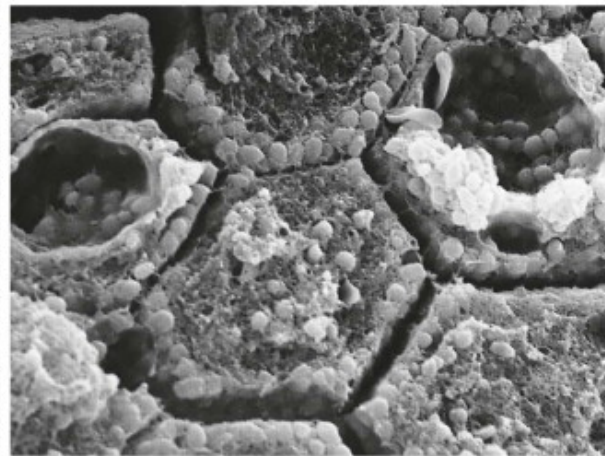
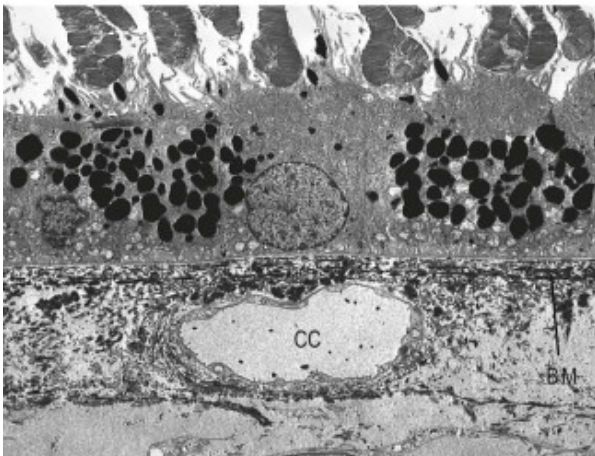
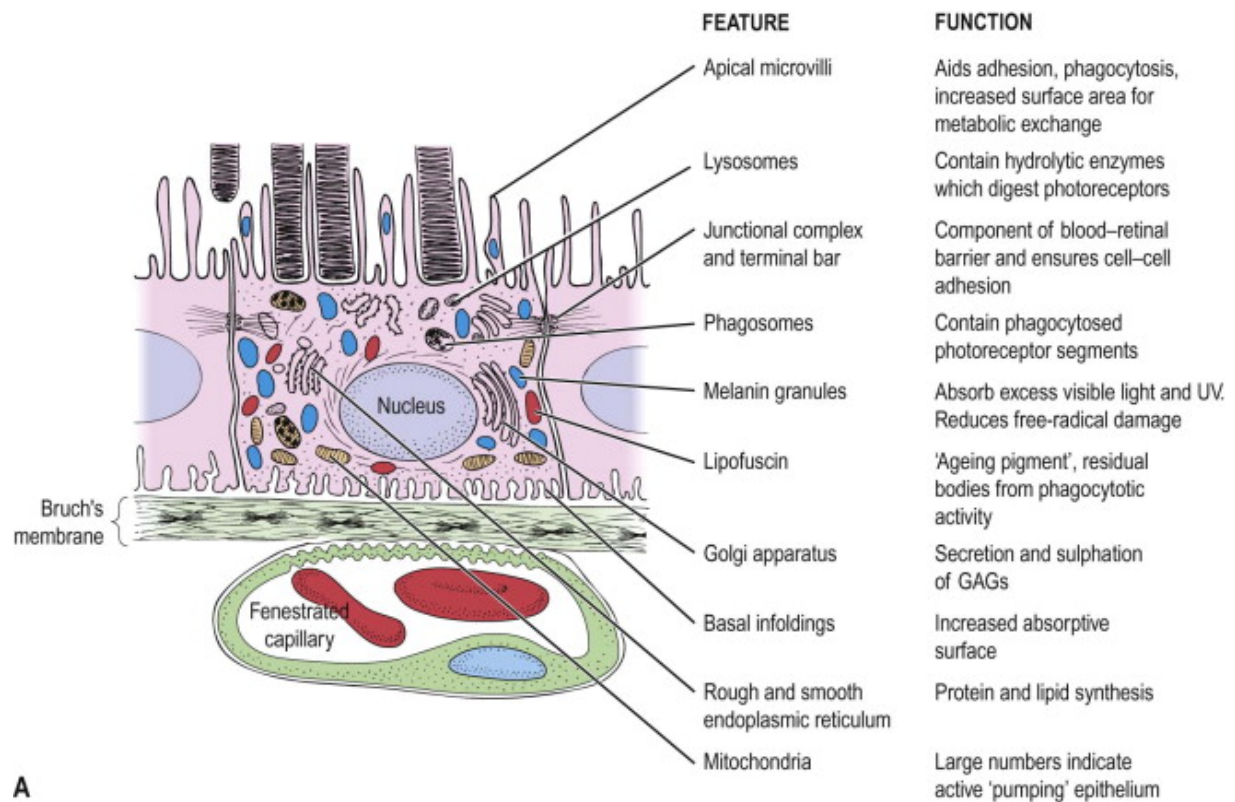
1.1.2. Le RPE et son rôle dans l'homéostasie rétinienne

Le RPE est une couche de cellules épithéliales hautement pigmentées postérieure à la neurorétine. Les villosités du côté apical des cellules du RPE englobent les POS. Du côté basal, la membrane de Bruch sépare le RPE de la vasculature choroïdienne. Le RPE a une pigmentation noire dû aux granules riches en mélanine (mélanosomes). Les cellules du RPE sont adhérentes l'une à l'autre dans un motif hexagonal (« *cobblestone* »), connectées par des jonctions serrées, et constituent avec les cellules endothéliales de la choroïde la barrière hématorétinienne. Elles empêchent de cette manière la diffusion libre d'ions et de grandes molécules (21). La structure du RPE est présentée à la figure 2.

Le RPE est essentiel au maintien des fonctions et de l'intégrité des photorécepteurs. Un rôle crucial du RPE est le recyclage des POS. L'extrémité apicale des segments externes contenant les disques photosensibles est débarrassée par les photorécepteurs de façon quotidienne. Environ 10 % des disques sont éliminés de la partie distale des POS par jour, et de nouveaux disques sont constamment générés du côté basal des segments externes. Les cellules du RPE phagocytent de leur côté apical et dégradent les disques dans leurs lysosomes. L'élimination des disques endommagés suit le rythme circadien et est régulée par la lumière (22). Chez les rats albinos soumis à un cycle lumière/obscurité 12/12 heures, il y a une augmentation brutale de l'élimination des disques des POS et de leur internalisation par les cellules du RPE au début de la séquence d'éclairage. En absence d'éclairage, l'élimination des disques des POS suit le rythme circadien pendant 3 jours (23). Cette élimination routinière de POS permet de se débarrasser des disques endommagés par la photo-oxydation. En effet, chez les rats soumis à une lumière intense à des cycles lumière/obscurité intermittents de 2-3 heures, le nombre de phagosomes dans les RPE augmente de façon dramatique alors que le traitement antioxydant à l'ascorbate diminue cette accumulation (24). Étant donné que les cellules du RPE sont post-mitotiques et que chacune d'elles s'occupe de plusieurs photorécepteurs, les cellules du RPE phagocytent une quantité énorme de matériaux au cours de leur vie, plus que n'importe quelle autre cellule du corps (22). Les modèles animaux ayant une activité phagocytaire du RPE défectueuse présentent une dégénérescence rétinienne (25-27). La phagocytose des POS par le RPE est donc critique au maintien de l'homéostasie rétinienne.

D'autres fonctions du RPE incluent le transport des nutriments et des ions de la circulation vers la neurorétine, la participation au cycle visuel (c.-à-d. la régénération du 11-cis rétinol qui est transformé en all-trans rétinol lors de la conversion du photon en signal électrique), la sécrétion de facteur neurotrophique, des tâches immunorégulatrices par la sécrétion de diverses cytokines et de *pigment epithelial growth factor* (PEGF), le maintien du privilège immun par les jonctions serrées, le maintien des choriocapillaires par la sécrétion de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'absorption de la lumière par les mélanosomes (21).

Figure 2. Structure du RPE



(A) Diagramme résumant les caractéristiques ultrastructurelles des cellules du RPE. (B) Micrographie électronique à transmission du RPE humain. (C) Micrographie de la surface apicale du RPE au microscope électronique à balayage. Magnification : B, x 2600, C, x 3600. Tirée de (28).

1.1.3. Ses facteurs de risque

La DMLA est une pathologie multifactorielle, avec plusieurs facteurs environnementaux et génétiques étant associés à son occurrence. Comme son nom l'indique, l'âge est le plus grand facteur de risque de la DMLA. Aux États-Unis, la prévalence de cette pathologie est de 1,47% chez les individus âgés de 40 ans et plus, mais elle atteint plus de 1 individu sur 10 chez les Caucasiens de 80 ans et plus (29). Des facteurs de risque qui entravent la circulation sanguine au niveau de l'œil comme le tabagisme (30) et l'hypertension (31) sont associés au risque de développer la DMLA. Le tabagisme est en effet le plus grand facteur de risque après l'âge. Une corrélation dose-réponse a été identifiée entre le nombre de paquets consommés et le risque de développer la DMLA. La cessation du tabagisme réduit son risque (30). Les antécédents familiaux (32), la diète (33, 34) et l'athérosclérose (35) sont d'autres facteurs qui semblent affecter son risque. La prévalence de la DMLA est la plus élevée chez les Caucasiens, suivis par les Asiatiques et les Hispaniques, puis chez les noirs (36). Les femmes présentent un risque plus élevé que les hommes (37).

Il est estimé que les facteurs génétiques constituent 50-57 % de la variabilité totale du risque de développer la DMLA (38). Dans l'étude Rotterdam, le risque à vie de développer la DMLA avancée était de 50 % chez un individu ayant un antécédent familial de la DMLA, comparé à 12 % chez un individu sans antécédent familial (32). De plus, les jumeaux monozygotes présentent un taux de concordance de la DMLA plus élevé que les jumeaux dizygotes (39). Les loci les plus fortement associés à la DMLA sont ceux du *complement factor H (CFH)* et de la région chromosomale 10q26, comportant les gènes *age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2)* et *HtrA serine peptidase 1 (HTRA1)* (40). L'*International AMD Genomics Consortium* a annoncé en 2017 que seul le *ARMS2* et non le *HTRA1* est responsable de cette association génétique (41), mais cela demeure une controverse. Une liste plus complète de facteurs de risque génétiques est présentée au Tableau 1.

Tableau 1. 19 gènes affectant le risque de développer la DMLA

Gène/Locus	EAF	OR*	P*	Voie affectée	Fonction des protéines encodées
<i>ARMS2/HTRA1</i>	0.3	2.76	4×10^{-540}	ECM (<i>ARMS2</i>); autre (<i>HTRA1</i>)	ARMS2 – lié au ECM HTRA1 – suggéré comme étant un régulateur de la croissance cellulaire
<i>CFH</i>	0.64	2.43	1×10^{-434}	Complément	Régulation négative du système de complément par l'inactivation du C3b (avec CFI)
<i>C2/CFB</i>	0.86	1.74	4×10^{-89}	Complément	C2 – clivé par le C1 en sérine protéinase qui se combine avec le facteur de compléments 4b pour former la C3 ou C5 convertase CFB - clivé par le facteur D en sérine protéase qui s'associe avec le C3b
<i>C3</i>	0.2	1.42	1×10^{-41}	Complément	Clivé par la C3 convertase durant l'activation des voies de complément
<i>TIMP3</i>	0.74	1.31	2×10^{-26}	ECM	Inhibiteur des métalloprotéinases de matrice qui dégradent l'ECM
<i>APOE</i>	0.83	1.3	2×10^{-20}	Métabolisme des lipides	Nécessaire au catabolisme des composants de lipoprotéines riches en triglycérides
<i>CETP</i>	0.76	1.22	7×10^{-16}	Métabolisme des lipides	Responsable du transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines
<i>VEGFA</i>	0.51	1.15	9×10^{-16}	Angiogenèse	Agit sur les cellules endothéliales; augmente la perméabilité vasculaire, induit l'angiogenèse, la vasculogenèse et la croissance des cellules endothéliales, promeut la migration cellulaire et inhibe l'apoptose
<i>TNFRSF10A</i>	0.48	1.15	3×10^{-15}	Apoptose	Induit l'apoptose
<i>LIPC</i>	0.48	1.13	3×10^{-11}	Métabolisme des lipides	Joue un rôle dans l'internalisation de lipoprotéines médiée par l'hydrolase et le récepteur de triglycérides
<i>CFI</i>	0.31	1.14	7×10^{-11}	Complément	Régule le système de complément par l'inactivation du C3b et du C4b (avec C4 et CFH, respectivement)

Gène/Locus	EAF	OR	P	Voie affectée	Fonction des protéines encodées
<i>COL10A1</i>	0.64	1.1	2×10^{-8}	ECM	Chaîne alpha du collagène de type X
<i>COL8A1/</i> <i>FILIP1L</i>	0.1	1.23	4×10^{-13}	ECM (<i>COL8A1</i>); angiogenèse (<i>FILIP1L</i>)	<i>COL8A1</i> – composant majeur de la membrane basale de l'épithélium cornéen <i>FILIP1L</i> – régulateur de l'angiogenèse sur les cellules épithéliales
<i>IER3/DDR1</i>	0.79	1.16	2×10^{-11}	Apoptose (<i>IER3</i>); ECM (<i>DDR1</i>)	<i>IER3</i> – joue un rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose induit par Fas ou TNF α <i>DDR1</i> – récepteur tyrosine kinase impliqué dans la régulation de la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire
<i>SCL16A8</i>	0.21	1.15	2×10^{-11}	Autre	Transport du lactate à travers la membrane cellulaire
<i>TGFBR1</i>	0.73	1.13	3×10^{-11}	Autre	Transduction du signal de TGF- β de la surface cellulaire au cytoplasme
<i>RAD51B</i>	0.61	1.11	9×10^{-11}	Apoptose	Nécessaire à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. La surexpression du RAD51B cause un retard du cycle cellulaire au stade G1 et l'apoptose
<i>ADAMTS9</i> <i>/MIR548A2</i>	0.46	1.1	5×10^{-9}	Apoptose (<i>ADAMTS9</i>)	Membre de la famille ADAMTS des désintégrines et métalloprotéinases; impliqués dans le clivage de protéoglycanes, le contrôle de la forme des organes durant le développement et l'inhibition de l'angiogenèse
<i>B3GALTL</i>	0.44	1.1	2×10^{-8}	Autre	Responsable du transfert du glucose au <i>O-linked fucosylglycans</i> sur les <i>TSP-1 repeats</i> de plusieurs protéines

EAF, *effect allele frequency*, OR, *odds ratio*, ECM, matrice extracellulaire. Adapté de (1).

1.1.4. Sa définition et sa classification

Selon l'*American Academy of Ophthalmology*, la DMLA est définie par la présence d'au moins une de ces caractéristiques :

- Des druses de taille au moins intermédiaire (63 μm ou plus en diamètre),
- Des anomalies du RPE comme l'hypo ou l'hyperpigmentation,
- Des pseudodruses réticulaires ou dépôts sous-rétiniens,
- Des caractéristiques des stades avancés de la maladie, c'est-à-dire l'atrophie géographique, la néovascularisation choroïdienne, la vasculopathie polypoïdale choroïdienne et/ou la prolifération angiomateuse rétinienne.

Les druses sont des dépôts extracellulaires jaunes riches en protéines et en lipides entre le RPE et la membrane de Bruch. Leur présence est l'une des premières manifestations de la DMLA (42). La présence de druses de taille inférieure à 60 μm est toutefois considérée comme étant une manifestation normale liée à la vieillesse (43).

Les patients peuvent être catégorisés en trois stades selon les manifestations cliniques : précoce, intermédiaire et avancé (44). Il est estimé que 1 patient de 70 ans et plus sur 3 progresse vers un stade avancé de la maladie en 10 ans (45). Au niveau pathophysiologique, la DMLA est classifiée sous deux formes : la forme humide (aussi appelée forme exsudative ou néovasculaire) et la forme sèche (non exsudative, non néovasculaire ou atrophique). La forme sèche de la DMLA englobe les phases précoces et intermédiaires ainsi que l'atrophie géographique (1). Les deux formes ne sont pas mutuellement exclusives (46).

1.1.4.1. La forme humide

La partie externe de la rétine, incluant les cellules du RPE, est nourrie par les vaisseaux sanguins de la choroïde, avec les choriocapillaires se localisant juste derrière la membrane de Bruch. La forme humide de la DMLA est caractérisée par une néovascularisation choroïdienne excessive. Les facteurs proangiogéniques sécrétés par les fibroblastes de la choroïde, les cellules du RPE et les macrophages induisent la poussée de nouveaux vaisseaux de la choroïde (47). En effet, le niveau de VEGF dans l'humeur aqueuse est élevé chez ces patients (48). Il est généralement admis que l'induction de la néovascularisation est secondaire à d'autres processus pathologiques, comme le stress oxydatif au niveau du RPE, l'hypoxie causée par l'accumulation de débris, l'inflammation ou la dégénérescence de la vasculature qui précéderait l'angiogenèse.

Les nouveaux vaisseaux franchissent éventuellement la membrane de Bruch vers l'espace sous-rétinien. Étant fragiles, ces vaisseaux sont facilement sujets à des déchirures ou à des fuites, causant de l'œdème et des hémorragies intrarétiniennes, ainsi que le détachement du RPE. Si une cicatrice se forme, elle peut affecter la vision de façon permanente (47).

La forme humide ne touche que 10-15 % des patients, mais est responsable de 90 % des cas de pertes de vision aiguë causée par la DMLA. De plus, cette forme de la DMLA progresse très rapidement vers la cécité. Aujourd'hui, des médicaments anti-angiogéniques ciblant le VEGF ou son récepteur sont utilisés par injection intravitréenne (46, 49). Les médicaments dont l'usage est approuvé par Santé Canada pour cette indication sont le pegaptanib (50), le ranibizumab (51), et l'aflibercept (52). Les études cliniques ont démontré que les inhibiteurs du VEGFA réduisent l'œdème et permettent parfois une régression des vaisseaux pathologiques (46, 49). La diminution du VEGF suite au traitement corrèle avec le résultat clinique (48). Malheureusement, le traitement est inefficace chez le quart des patients (53).

1.1.4.2. L'atrophie géographique

L'atrophie géographique est caractérisée par des régions de dégénérescence de la rétine (choroïde, RPE et neurones). Les régions atrophiques s'agrandissent ou augmentent en nombre avec les années (54). Si elles épargnent la fovéa, la vision des patients est affectée de façon significative que très tard dans la maladie (55).

Il a été proposé que la perte des photorécepteurs est la conséquence d'une dysfonction du RPE. Sarks et coll. ont observé une accumulation de débris de phagosomes accompagnée d'un élargissement et d'un détachement des cellules du RPE chez les patients présentant une géographie atrophique. La perte des cellules du RPE semblait précéder la perte intégrale des photorécepteurs (56, 57). L'augmentation de l'autofluorescence au niveau du fundus des patients découle d'une dysfonction des cellules du RPE. Il est indicateur de l'accumulation de lipofuscine, des granules autofluorescents brun-jaunes qui sont cytotoxiques et qui résultent d'une digestion incomplète de POS dans les lysosomes du RPE (58). Cette accumulation d'inclusions autofluorescentes au niveau du RPE corrèle inversement avec l'épaisseur des dépôts sous le RPE (59). Bien que le rôle exact de l'accumulation de druses dans le

développement de l'atrophie géographique est encore peu compris, la présence de druses larges et confluentes (*soft drusen*, par opposition au *hard drusen* qui sont petits et éloignés l'un de l'autre) est connue comme étant un facteur de risque de l'atrophie géographique (60). Par opposition, l'involution choroïdienne n'est pas nécessairement associée à la perte de l'intégrité des photorécepteurs, ce qui suggère qu'elle survient de façon secondaire à la perte des cellules du RPE qui sécrètent du VEGF (59).

1.1.5. La pathogenèse de la DMLA de forme sèche

La pathophysiologie de la forme sèche de la DMLA est peu comprise. Néanmoins, des études biochimiques, histologiques et génétiques suggèrent une profonde implication du stress oxydatif, de l'inflammation et de la dysfonction lipidique (12, 61).

1.1.5.1. Les changements cellulaires associés à l'âge

Le vieillissement est associé à plusieurs changements cellulaires. La manifestation de ces changements est d'autant plus prononcée chez les cellules post-mitotiques (62).

Avec l'âge, la capacité antioxydante diminue et l'induction du système en réponse aux insultes s'affaiblit (63). En particulier, le système du *nuclear factor erythroid 2 Like 2* (NFE2L2) est affecté par l'âge chez le RPE. Sachdeva et coll. ont observé que l'expression basale du *heme oxygenase 1* (*Hmox1*), *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1* (*Nqo1*) et *glutamate-cysteine ligase modifier subunit* (*Gclm*) était plus élevée chez le RPE de souris âgées (âgées de 15 mois) que celui de jeunes souris (âgées de 2 mois), ce qui indique la présence d'un stress oxydatif chronique. Ces souris âgées répondaient par contre moins bien au stress oxydatif induit par l'injection systémique de NaIO₃ (iodate de sodium), ce qui était associé à un plus grand niveau de marqueurs de stress oxydatif dans le RPE (64).

En 2002, Brunk et Teiman ont proposé la *mitochondrial-lysosomal axis theory of aging* qui suggère que le dysfonctionnement de l'axe mitochondrie-lysosome est responsable de la mort cellulaire liée au vieillissement. Avec l'âge, les mitochondries gonflent et subissent une

désorganisation structurelle (62). Ce phénomène a été confirmé par He *et al.* chez le RPE : les mitochondries diminuent en nombre et subissent des altérations morphologiques (taille, forme, densité de la matrice, architecture des membranes mitochondriales, intégrité membranaire) (65). Il a également été observé que les cellules du RPE des sujets âgés ont une activité mitochondriale réduite (65). Le stress oxydatif chronique dans le contexte du vieillissement cause l'endommagement des mitochondries, mais Brunk et Teiman ont proposé que la dysfonction lysosomale a également un rôle à jouer. Avec l'âge, les lysosomes qui sont normalement responsables de la dégradation des mitochondries défectueuses accumulent des lipofuscines (62). Les cellules du RPE sont particulièrement vulnérables à l'accumulation de lipofuscines due à la grande quantité de POS qu'elles phagocytent. En effet, les lipofuscines qui se forment dans le RPE résultent majoritairement d'une dégradation incomplète de POS (66). La présence de ces matériaux non dégradables dans les lysosomes rend cette organelle dysfonctionnelle (62). En particulier, le N-rétinyl-N-rétinylidène éthanolamine (A2E) qui dérive de la dégradation des POS est la composante majeure des lipofuscines dans le RPE; il a été démontré comme étant délétère pour la fonction lysosomale, affectant à son tour la capacité phagocytaire des cellules (67, 68).

Une diminution du nombre de cellules du RPE avec l'âge due à leur mort apoptotique a été observée chez les humains. Étant mitotiquement inactives, ces cellules ne sont essentiellement jamais remplacées. La charge métabolique de chaque cellule à maintenir les photorécepteurs augmente, ce qui contribuerait probablement à la pathogenèse de la DMLA de forme sèche (69).

1.1.5.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif représente un état de déséquilibre entre la production de radicaux libres (dont les espèces réactives de l'oxygène ou ROS) et le système antioxydant qui élimine l'excès de radicaux libres. Ces radicaux libres jouent des rôles importants dans la signalisation cellulaire, mais deviennent délétères pour la cellule s'ils sont trop abondants (61).

Il est évident que le stress oxydatif contribue au développement de la DMLA. Une augmentation de l'expression des enzymes antioxydants *superoxide dismutase 1* et *2* (SOD1 et

SOD2) et de *catalase* (CAT), suggestive d'un stress oxydatif, est observée chez le RPE des patients qui ont la DMLA (70). Le tabagisme est l'un des plus grands facteurs de risque de la DMLA (30). Des polymorphismes au niveau des gènes codants pour les sous-unités du NADH déshydrogénase (complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale) (71, 72) et de la dismutase de superoxyde mitochondrial SOD2 (73) sont associés au risque de développer la DMLA, et une dégénérescence rétinienne est observée chez les souris déficientes en *Sod1*- (74) ou *Nfe2l2*- (75) et la souris *Sod2* knockdown (76). Par opposition, la consommation d'une diète riche en antioxydant semble avoir un effet protecteur (33). La supplémentation combinatoire d'antioxydants (vitamines C et E, lutéine et zéaxanthine) et de zinc et de cuivre est aujourd'hui recommandée aux patients pour ralentir la progression de la DMLA de forme sèche (77).

Plusieurs caractéristiques du RPE le rendent vulnérable aux dommages oxydatifs : 1) le RPE est constamment exposé à la lumière, une source de photo-oxydation, 2) il est l'un des tissus les plus métaboliquement actifs du corps, ingérant énormément de lipides, ce qui résulte en une production de ROS accrue, 3) les cellules du RPE chez l'adulte sont majoritairement post-mitotiques donc elles ne peuvent pas se diviser pour diminuer leur charge de matériaux/organelles endommagés, et 4) il est adjacent au flot de la choroïde qui est très richement oxygéné (61). La charge métabolique est d'autant plus élevée au niveau de la macula, ayant un plus grand nombre de photorécepteurs par cellules du RPE, qu'en périphérie. Les cellules du RPE sont le type cellulaire avec la plus grande consommation d'oxygène dans le corps (14).

Les radicaux libres peuvent causer l'oxydation de protéines, des lipides et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Le 4-hydroxynonénal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) sont des produits de peroxydation de lipides qui s'accumulent lors de la DMLA. Ces produits de peroxydation de lipides sont stressants pour les cellules du RPE et doivent être éliminés par l'exocytose, la transcytose ou l'autophagie, sans quoi ils peuvent causer la mort des cellules (12). Entre autres, ces produits de peroxydation de lipides ont un effet délétère sur les fonctions lysosomale et phagocytaire des RPE (78). Les produits de peroxydation de lipides s'attachent aux protéines cellulaires par liaison covalente, formant ce qu'on appelle des *advanced lipid peroxidation end products*. Les *advanced lipid peroxidation end products* sont présents dans les lipofuscines, les druses et la membrane de Bruch des patients atteints de la DMLA (79, 80).

L'A2E est un produit de condensation du *all-trans rétinol* qui est présent en grande quantité dans les lipofuscines du RPE. Il est l'une des sources du stress oxydatif chez le RPE : il est photosensibilisant et il stimule la production de H_2O_2 par le NADPH oxydase. Des études *in vitro* ont démontré que l'A2E provoque une dysfonction mitochondriale en combinaison avec la lumière (81), perturbe le métabolisme du cholestérol (82), augmente la sécrétion de cytokines inflammatoires et de VEGF par les cellules du RPE, ainsi que la mort cellulaire (83). L'administration intraveineuse d'A2E cause la dégénérescence rétinienne chez le lapin (84).

Le fer intrarétinien augmente avec l'âge (85) et les patients qui ont la DMLA présentent une accumulation de fer au niveau du RPE comparés aux donneurs contrôles (86). Il n'est pas clair si cette accumulation de fer est une conséquence ou une des causes de la DMLA, mais l'inflammation, le stress oxydatif et l'hypoxie sont connus comme causant une dérégulation de l'homéostasie ferrique (87). Un défaut au niveau de la phagocytose des POS par le RPE a également été identifié comme causant une accumulation de fer dans la rétine chez le rat (88). L'accumulation de fer provoque à son tour un stress oxydatif par la réaction de Fenton, le processus catalytique par lequel le H_2O_2 est converti en radicaux libres toxiques par le Fe^{2+} . L'administration intravitréale de fer chez la souris résulte en une augmentation de ROS chez les photorécepteurs, une augmentation de la peroxydation des lipides et une dégénérescence rétinienne (89). Les patients qui ont une déficience en céruloplasmine qui convertit le Fe^{2+} en Fe^{3+} manifestent une dégénérescence au niveau du RPE, leur hypo et hyperpigmentation, une augmentation de l'autofluorescence et des druses (90).

1.1.5.3. *L'inflammation*

L'inflammation est une réponse immunitaire de notre corps qui permet l'élimination de pathogènes et la réparation des tissus endommagés. La surveillance immune est essentielle au maintien de l'homéostasie rétinienne, mais lorsque l'inflammation persiste elle cause au contraire des dommages aux tissus. L'inflammation chronique est à la base de plusieurs pathologies, dont des maladies liées à l'âge (91).

L'implication de l'inflammation dans la pathogenèse de la DMLA a été proposée pour la première lorsqu'il a été découvert que des polymorphismes au niveau du *CFH* augmentent

d'environ 7 fois plus le risque de développer la maladie (92). Aujourd'hui il est connu que les druses contiennent de multiples facteurs pro-inflammatoires, notamment le peptide β -amyloïde (93), la lipoprotéine de basse densité oxydée (LDLox) (94), des protéines de phases aiguës, des IgG et des compléments (C3, C5b-9) (95). Il semble donc qu'une inflammation locale soit impliquée dans la pathogenèse de la DMLA à des phases encore précoces. La DMLA est également associée à l'activation de cellules immunitaires résidentes (microglies, cellules de Müller) (96) et une infiltration de cellules immunes par la circulation choroïdienne. Les macrophages activés s'accumulent dans l'espace sous-rétinien des patients (97) et de plusieurs modèles murins, tels que nous verrons dans la section 1.1.7. Cependant, les phagocytes monocytaires ne sont pas les seuls à participer à l'inflammation. Les cellules du RPE peuvent également sécréter des cytokines pro-inflammatoires et expriment des *toll-like receptors* (TLRs) et les *major histocompatibility complexes* (MHCs) pour agir comme cellules présentatrices d'antigènes (98).

L'activation des compléments est un système de défense immunitaire inné. Les compléments et leurs facteurs régulateurs sont synthétisés au foie et sont relâchés dans la circulation systémique. Il existe trois voies d'activation : la voie classique, la voie lectine liant le mannose et la voie alternative. Contrairement aux deux autres voies qui nécessitent la liaison de compléments aux anticorps ou à la lectine liant le mannose, la voie alternative peut débuter spontanément par l'hydrolyse du C3 et doit donc être régulée de façon étroite par des facteurs modulateurs. L'activation excessive de la cascade alternative peut résulter à une attaque de soi par la formation du complexe d'attaque membranaire et provoquer une réponse inflammatoire aberrante (99). La souris *Cfh*^{-/-} (100) et la souris surexprimant le C3 (101) présentent une dégénérescence rétinienne, ce qui supporte l'implication du système de compléments dans la DMLA. Les patients qui ont la DMLA ont une concentration élevée de C3a, C3d, Ba, C5a et C5b-9 dans leur plasma (102). Certains compléments et leurs régulateurs peuvent être produits par le RPE et la choroïde. Dans la macula des patients atteints de la DMLA, il y a une diminution de l'expression de régulateurs négatifs du complément (103). Entre autres, le CFH qui est principalement sécrété du côté apical du RPE (104) est diminué dans l'atrophie géographique (105). Chen et coll. ont observé que les POS oxydés causent une diminution de la production du CFH par le RPE, suggérant que le stress oxydatif est à l'origine des problèmes (106).

L'inflammasome est un complexe multiprotéinique qui détecte le danger cellulaire et qui implémente une défense immunitaire par la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. L'inflammasome peut être activé par différents stimuli comme le stress oxydatif et le C5b-9. L'activation de l'inflammasome requiert deux signaux : un premier signal pour augmenter de façon transcriptionnelle ses composantes (*nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3* ou NLRP3, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* ou ASC, procaspase-1) et un deuxième signal pour l'oligomérisation de ses composantes qui mèneront à l'activation de la caspase-1 et le clivage de l'IL-1 β et de l'IL-18. Tseng et coll. ont observé une augmentation du NLRP3 au niveau du RPE des patients qui ont l'atrophie géographique (107). Des études *in vitro* ont démontré que la lumière (108), l'A2E (109) et le NaIO₃ (110) peuvent activer l'inflammasome chez les cellules du RPE, ce qui suggère que l'activation de l'inflammasome pourrait être secondaire au stress oxydatif. Les dommages oxydatifs au niveau de la mitochondrie (111) et la déstabilisation lysosomale (107) activent également l'inflammasome chez les cellules du RPE en culture. L'activation de l'inflammasome chez le RPE est associée à la pyroptose, la mort inflammatoire dépendante de la caspase 1 (112).

L'inflammation peut produire un stress oxydatif, mais il est cru que c'est plutôt le stress oxydatif qui cause l'inflammation dans la DMLA. La modification oxydative de lipides, de protéines et de l'ADN génère des *oxidation-specific epitopes* qui sont pro-inflammatoires. Ils sont reconnus comme des signaux de danger et activent le système immunitaire. Les produits de glycation avancé (AGEs), les phospholipides oxydés et les produits de peroxydation des lipides sont des exemples d'*oxidation-specific epitopes* qui s'accumulent dans la DMLA (61). En particulier, le carboxyéthylpyrrole (CEP) qui dérive de l'oxydation de l'acide docosahexaénoïque (DHA) des POS est bien établi comme induisant l'inflammation (113). Les patients souffrant de la DMLA ont une quantité plus abondante de CEP dans la rétine et d'auto-anticorps anti-CEP dans leur plasma (114). De plus, l'immunisation des souris avec le CEP cause une dégénérescence rétinienne (115).

1.1.5.4. La dysfonction lipidique

Les études qui ont vérifié l'association entre le niveau de lipides sériques, l'usage de statines ou les maladies cardiovasculaires et la DMLA ont donné des résultats inconsistants. Cependant, il existe bel et bien une dysfonction lipidique dans cette maladie. Les loci de *apolipoprotein E (APOE)*, *cholesteryl ester transfer protein (CETP)*, *lipase C, hepatic type (LIPC)* et *ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1)*, gènes régulant le transport du cholestérol, sont tous associés avec la DMLA (12, 116). Plusieurs modèles murins avec un défaut dans l'homéostasie lipidique présentent des phénotypes similaires à la DMLA, tels que nous verrons dans la section 1.1.7.

Avec l'âge, la membrane de Bruch s'épaissit dû à des dépôts basaux au RPE. Il y a deux types de dépôts : les dépôts laminaires basals (BlamD) et les dépôts linéaires basals (BlinD) (12). Les BlamD désignent les dépôts qui s'accumulent entre la membrane plasmique et la membrane basale des cellules du RPE. Ils ont les mêmes composantes que la membrane basale : collagène, laminine et protéoglycanes héparan sulfate (117). Les BlamD sont seulement associés à la DMLA lorsqu'ils s'épaississent et qu'ils accumulent des débris hétérogènes comme des facteurs inflammatoires et des lipoprotéines. Les BlinD désignent les dépôts riches en lipides qui s'accumulent entre la membrane basale des cellules du RPE et la zone de collagène interne. Ils sont des marqueurs histopathologiques de la DMLA. Les druses semblent dérivées d'un agrandissement de BlinD qui a accumulé une grande quantité de lipides et de divers débris (118).

Les dépôts basaux et les druses contiennent des lipoprotéines qui s'accumulent avec l'âge (119). Ces lipoprotéines ne dérivent pas directement du plasma, car elles sont différentes de celles du plasma en termes de densité, de la distribution du cholestérol et de morphologie. Elles ne dérivent pas non plus des POS, car elles ne contiennent pas de DHA (120). Une hypothèse qui a été émise est que les cellules du RPE sécrètent les lipoprotéines suite à leur surcharge en lipides. Le modèle de 2-lésions 2-compartiments proposent que 1) les lipoprotéines qui dérivent de la circulation choroïdienne sont internalisées par les cellules du RPE en tant que source d'énergie, 2) certaines lipoprotéines sont retenues au niveau de la matrice extracellulaire de la membrane de Bruch et s'accumulent avec l'âge, 3) les cellules du RPE emmagasinent les triglycérides dérivés de la phagocytose des POS et les recyclent vers les photorécepteurs alors que 4) les cholestérols non estérifiés s'assemblent en lipoprotéines et sont sécrétés du côté

basal ; les lipoprotéines qui s'accumulent se font oxyder et promeuvent l'inflammation (121). Plus récemment, la présence de dépôts du côté apical du RPE, *subretinal drusenoid deposits* ou pseudodruses, a été associée avec l'occurrence de la DMLA (122). Ces pseudodruses ont une composition très similaire aux druses. Les pseudodruses semblent provenir du RPE, ce qui suggère que la nature vectorielle des transports de lipides par le RPE est possiblement altérée dans la DMLA (123).

Il a été proposé que les dépôts basaux et les druses constituent une barrière lipidique qui accumule des facteurs inflammatoires et qui attire les cellules immunes (124). La LDLox dans ces dépôts peut provoquer l'activation des compléments (125). Les oxystérols qui sont générés par l'oxydation des esters de cholestérols causent une augmentation de ROS, une dysfonction mitochondriale, une réponse inflammatoire, la production de peptide β -amyloïde et la mort apoptotique des cellules du RPE (126, 127).

1.1.5.5. La dysfonction mitochondriale

La dysfonction mitochondriale est impliquée dans de nombreuses maladies liées à l'âge incluant la DMLA (128). La mitochondrie est à la fois une source majeure et une cible de ROS. Durant la production d'adenosine triphosphate (ATP), les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale génèrent des ROS qui peuvent se répandre à l'extérieur de l'organelle. Lorsque la mitochondrie est endommagée, la formation de ROS est d'autant plus augmentée, surtout au niveau des complexes I et III (61).

L'ADN mitochondrial encode principalement les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Les dommages à ce niveau sont donc critiques pour le bon fonctionnement de l'organelle et la production d'énergie pour soutenir les activités cellulaires (129). Auparavant, on pensait que la mitochondrie est dépourvue de mécanisme de réparation de l'ADN, ce qui la rendrait très vulnérable au stress oxydatif. Il est maintenant connu que la mitochondrie possède ses propres mécanismes de réparation. Néanmoins, l'ADN mitochondrial reste plus vulnérable que l'ADN nucléaire, car il est dépourvu d'histones (130). Les cellules du RPE provenant de patients avec la DMLA ont été observées comme ayant une moins bonne capacité de réparation

de l'ADN mitochondrial (131), ainsi qu'une augmentation de dommages au niveau de l'ADN mitochondrial (132). Comme les cellules du RPE sont essentiellement post-mitotiques, elles sont incapables de se débarrasser des mitochondries par la division cellulaire et la mitochondrie réplique son matériel génétique indépendamment du cycle cellulaire (129).

Il a été observé que les altérations morphologiques de la mitochondrie associées à l'âge chez le RPE sont encore plus prononcées chez les patients qui ont la DMLA (133). En concordance avec cette observation, les cellules du RPE isolées des patients ont une respiration et une production d'ATP réduites comparées à celles des donneurs de mêmes âges (134).

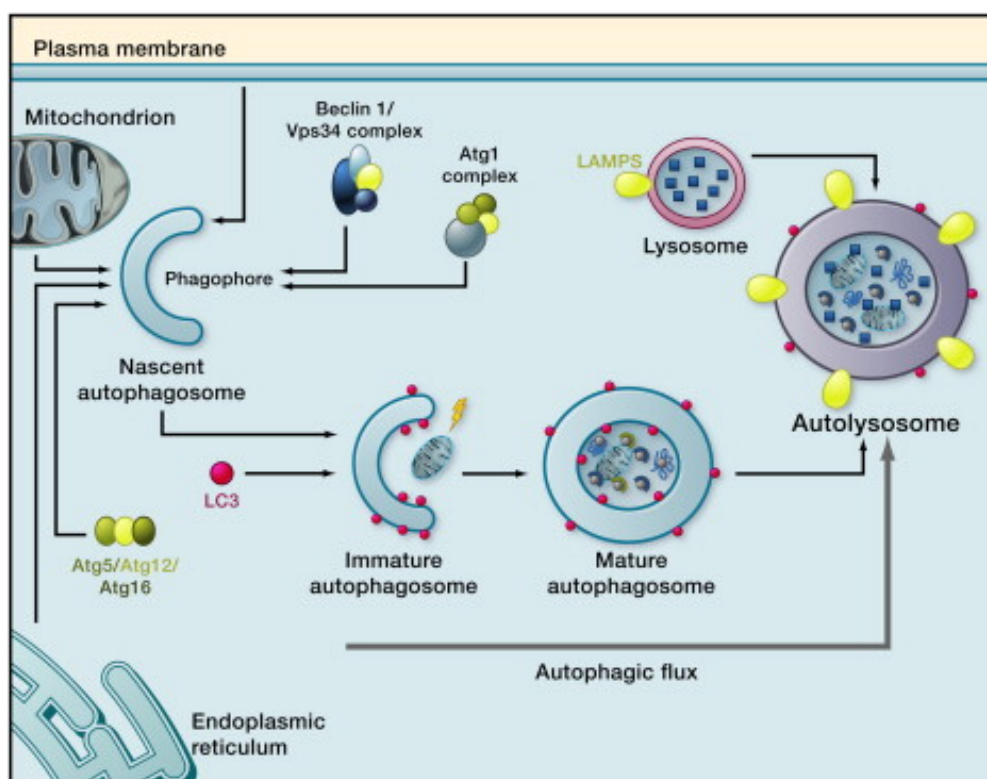
1.1.5.6. La dysfonction autophagique

L'autophagie est un système de dégradation intracellulaire qui permet le recyclage de composantes cytosoliques. Il constitue un système de défense adaptatif qui protège la cellule contre le stress oxydatif par la dégradation de protéines et d'organelles endommagées (p. ex. les mitochondries). Il existe trois types d'autophagie chez les mammifères : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperons et la macroautophagie. Seule la macroautophagie sera discutée. La formation d'autophagosomes, vésicules spécialisées à double membrane, implique plusieurs étapes : la formation de phagophores (initiation et nucléation), son élongation et la capture du cargo, sa fermeture et sa maturation. Une fois matures, ces autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes pour la dégradation des matériaux qu'ils contiennent (135). Un schéma simplifié du processus autophagique est présenté à la figure 3.

Il est de plus en plus évident que la dysfonction autophagique est impliquée dans la pathogenèse de la DMLA. Le stress oxydatif continu, l'accumulation de lipofuscines et les produits de peroxydation de lipides diminuent la fonction lysosomale et en conséquence le flux autophagique. Le dysfonctionnement autophagique dans un état de stress oxydatif cause une accumulation de protéines promptes à l'agrégation et éventuellement la mort cellulaire (135). Une altération de l'expression de protéines reliées à l'autophagie a été observée dans la rétine des humains qui ont la DMLA et des modèles murins de la DMLA (136). Golestaneh et coll. ont observés que les cellules du RPE isolées de patients présentent un défaut dans le flux autophagique : elles avaient plus d'autophagosomes en condition basale, l'autophagie induite

par la privation de nutriment ne diminuait pas le niveau de p62, une protéine cargo des autophagosomes qui lie les protéines polyubiquitinées, et la morphologie des lysosomes était altérée. De plus, ces cellules avaient une plus grande susceptibilité au stress oxydatif et une production de ROS accrue lors d'un traitement au H₂O₂ (137). Il est connu que la dérégulation de l'autophagie active l'inflammasome, probablement de façon secondaire à une dysfonction mitochondriale (129, 138, 139). Liu et coll. ont observé que l'inhibition de l'autophagie chez les cellules du RPE promeut l'inflammation élicitée par les macrophages en co-culture, ainsi que l'infiltration de macrophages activés dans l'espace sous-rétinien *in vivo*. Ils ont également démontré que l'inhibition de l'autophagie cause la mort cellulaire apoptotique des cellules du RPE *in vitro*. (140). Finalement, la déficience spécifique au RPE en *autophagy-related 5* ou 7 (*Atg5* ou *Atg7*) cause une dégénérescence rétinienne chez la souris (141).

Figure 3. Un aperçu de la macroautophagie



Indépendamment de l'origine de la double membrane, les autophagosomes internalisent une portion du cytoplasme ou des cargos sélectifs, se refermant pour devenir des autophagosomes matures. Dans ce processus complexe, une série de protéines reliées à l'autophagie et des complexes de protéines sont impliqués de façon séquentielle. Les autophagosomes fusionnent

éventuellement avec les lysosomes pour former des autolysosomes, dans lesquels les cargos autophagiques sont dégradés. Les biomolécules qui en résultent sont finalement recyclées vers le cytoplasme. Tirée de (142).

1.1.6. Les modèles *in vitro* des dommages oxydatifs causés au RPE

Les cellules du RPE en culture sont un outil utile pour étudier leurs fonctions physiologiques et leur réponse en condition pathologique, tel que lors d'un stress oxydatif.

Il y a deux sources de cellules du RPE pour leur étude *in vitro* : les cellules primaires et les lignées immortalisées. Dans les pays où une banque d'yeux est établie, les cellules humaines obtenues de cadavres sont disponibles au passage 2 (143). Les cellules du RPE fœtales ont un profil d'expression d'acide ribonucléique messager (ARNm) similaire aux cellules provenant d'adultes (144). Lorsque les cellules proviennent des humains adultes, une comparaison entre les cellules de patients qui ont la DMLA et celles de donneurs témoins est possible (70, 131, 134). Lorsque les yeux humains ne sont pas disponibles, les cellules du RPE d'animaux sont utilisées. De façon générale, les cellules primaires ont des variabilités interindividuelles et une capacité répliquative limitée (143). Les lignées de RPE incluent celles qui se sont transformées de façon spontanée et celles qui ont été immortalisées. Elles peuvent être d'origine humaine ou animale, comme le RPE-J qui provient de rat. Les cellules ARPE-19 dérivent des cellules du RPE d'un homme de 19 ans décédé durant un accident de moto qui se sont transformées de façon spontanée. Cette lignée est souvent utilisée pour étudier la DMLA. Les cellules hTERT RPE-1 dérivent des cellules du RPE d'une fillette de 1 an qui ont été transfectées avec un plasmide exprimant la *telomerase reverse transcriptase* humain (hTERT). Elles sont souvent utilisées pour l'étude du chromosome X inactif (143). Les deux lignées présentent une capacité phagocytaire (145, 146), expriment les gènes associés au cycle visuel et les marqueurs du RPE (147, 148), forment une monocouche de morphologie « *cobblestone* » (148, 149) et se polarisent (147, 148) avec la différenciation. Lors de leur différenciation, les cellules hTERT RPE-1 produisent de façon spontanée des pigments de mélanine (149). Les caractéristiques des cellules ARPE-19 diffèrent considérablement selon les conditions de culture. À un nombre de passages élevé, un mélange de cellules allongées et polygonales est observé (150). Mis à part les cellules

primaires et les lignées, l'usage de cellules du RPE dérivées de cellules souches (pluripotentes ou embryonniques) a également été proposé pour étudier le RPE et la DMLA (151).

L'usage des agents oxydants/cytotoxiques est une stratégie très couramment employée pour étudier la réponse des cellules du RPE contre le stress oxydatif et les dysfonctions qu'elles présenteraient dans un contexte pathologique. Ce type de modèle est également employé pour valider l'effet antioxydant, cytoprotecteur et/ou anti-inflammatoire des agents pharmacologiques. Les agents oxydants classiques comme le H_2O_2 et sa forme stable tert-butyl hydroperoxide (152), ainsi que des métabolites cytotoxiques comme le peptide β -amyloïde (153), la LDLox (154) et l'A2E/all-trans rétinol en combinaison avec la photo-oxydation (155) sont utilisés pour induire des dommages aux cellules. L'exposition à la lumière est utilisée tant *in vivo* (156, 157) qu'*in vitro* (108) comme source de photo-oxydation. Dans notre étude, nous avons utilisé l'agent oxydant $NaIO_3$ pour induire un stress oxydatif chez le RPE. En 1941, Sorsby a décrit que l'injection intraveineuse du $NaIO_3$ induit une dégénérescence rétinienne par une cytotoxicité sélective au RPE (158). Dès lors, le traitement au $NaIO_3$ a longtemps été utilisé comme un modèle reproductible de la DMLA de forme sèche tant chez les animaux (64, 159-161) que chez les cellules du RPE en culture (110, 160, 162-165).

1.1.7. Les modèles précliniques de la DMLA de forme sèche

Plusieurs modèles de mammifères et de non mammifères (p. ex. les poissons-zèbres exposés à une lumière induisant une photo-oxydation (166)), ont été développés pour modéliser la DMLA. Cependant, la macula est une structure unique aux primates et il n'y a aucun modèle animal de la DMLA de forme sèche qui reproduit parfaitement les manifestations pathophysiologiques de la maladie tel qu'observé chez les humains. Quelques modèles murins et de primates sont présentés ici.

Bien que la structure rétinienne des rongeurs et des humains comporte plusieurs différences (167), de nombreux modèles rongeurs de la DMLA de forme sèche ont été proposés. Ces modèles se basent sur les facteurs de risque de la DMLA : l'âge, les risques environnementaux (p. ex. tabagisme, diète) ou génétiques, le système de complément et d'autres médiateurs de l'inflammation, le stress oxydatif et la dysfonction métabolique. Souvent,

plusieurs facteurs sont combinés dans un seul modèle. Les caractéristiques qui sont recherchés dans ces modèles sont l'épaississement de la membrane de Bruch, l'accumulation de dépôts basaux lipidiques et protéiques, des anomalies du RPE, l'inflammation et la perte des photorécepteurs (168). Les modèles rongeurs ne manifestent pas d'accumulation de druses, mais des dépôts blanchâtres similaires sont observés, avec des compositions et une localisation différente des druses humains (169). Des exemples de modèles murins sont présentés au tableau 2.

Chez certains primates, des manifestations similaires à la DMLA ont pu être observées avec le vieillissement (170, 171). Chez les macaques crabiers (*Macaca fascicularis*), la composition des druses est très similaire à celle des humains (95), comportant entre autres le peptide β -amyloïde, la vitronectine, l'APOE et des compléments (172). De plus, des polymorphismes génétiques similaires ont été identifiés au niveau du *HTRA1/ARMS2* qui sont associés au développement de druses chez les macaques Rhesus (*Macaca mulatta*) (173), ce qui suggère qu'ils partagent des facteurs de risque génétiques similaires aux humains. Les primates non humains développent des druses à des âges plus précoces que chez les humains : environ la moitié des macaques Rhesus présentent une maculopathie drusenoïdes à l'âge de 10-12 ans, ce qui correspondrait à 30-36 ans chez l'humain (170, 171). Dans le modèle établi par Dawson et coll., la majorité des singes Rhesus ont démontré l'apparition de druses vers l'âge de 5 ans (174). Cependant, l'atrophie géographique n'a jamais été observée chez les primates.

Comme chez les rongeurs, le NaIO_3 peut être utilisé chez les singes pour provoquer des changements morphologiques et fonctionnels au niveau de la rétine. Liu et coll. ont en effet démontré que des doses sous-létales de NaIO_3 en injection intraveineuse causent une dégénérescence du RPE, et secondairement une dégénérescence des photorécepteurs sans toutefois affecter la couche rétinienne interne des singes *Cynomolgus*. La fonction des bâtonnets et des cônes mesurée par l'électrorétinographie était également compromise dans ce modèle (159). En 2018, une injection intravitréenne du NaIO_3 a été tentée chez les singes pour éviter la toxicité systémique à haute dose (175).

Tableau 2. Modèles murins de la DMLA de forme sèche

VOIE AFFECTÉE	Épaississement de la BM	Dépôts sous rétiens <i>drusen-like</i>	Changement pigmentaire/morphologique ou atrophie du RPE	Augmentation de l'A2E ou de l'auto fluorescence	Dépôt de compléments	Accumulation de cellules immunitaires	Atrophie des photorécepteurs ou altération à l'électrorétiogramme	RÉFÉRENCE
Système du complément								
Souris <i>Cfh</i> ^{-/-}				×	×		×	(100)
Souris transgénique <i>Cfh</i> chimérique	×	×			×	×		(176)
Souris injectée à l'adénovirus exprimant le C3			×		×		×	(101)
Chimiokines								
Souris <i>Ccl2</i> ^{-/-} et <i>Ccr2</i> ^{-/-}	×	×	×	×			×	(177)
Souris <i>Ccl2</i> ^{-/-}		×	×	×		×	-	(178)
Souris <i>Cx3cr1</i> ^{-/-}		×			×	×	×	(179)
Souris <i>Ccl2</i> ^{-/-} et <i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	×	×	×	×	×		×	(180)
Stress oxydatif								
Immunisation de la souris avec le CEP	×	×	×		×	×	×	(115)
Souris <i>Sod1</i> ^{-/-}	×	×					×	(74)
Souris avec un knockdown somatique du <i>sod2</i>	×		×	×			×	(76)
Souris <i>Nfe2l2</i> ^{-/-}	×	×	×	×	×			(75)
Souris <i>Nfe2l2</i> ^{-/-} et <i>Pgc1a</i> ^{-/-}	×	×				×	×	(181)
Souris <i>Pgc1a</i> ^{+/-} avec une diète riche en gras	×		×				×	(182)
Souris exposée à la fumée de cigarette +/- une diète riche en gras +/- une lumière bleue	×	×						(156)
Injection systémique de la souris avec le NaIO ₃			×			×	×	(161)
Métabolisme du glucose/lipide								
Souris âgées soumises à une diète riche en gras +/- une lumière bleue	×	×						(157)
Souris avec une diète à index glycémique élevé	×	×					×	(183, 184)
Souris <i>ApoE</i> ^{-/-}	×	×						(185)
Souris transgénique <i>APOE</i> *4 +/- une diète riche en gras	×	×	×				×	(186)
Souris transgénique <i>APOE</i> *3-Leiden +/- une diète riche en gras		×	×					(187)

Souris transgénique <i>APOB100</i> avec une diète riche en gras	×	×						(188)
Souris <i>Ldlr</i> ^{-/-} avec une diète riche en gras	×	×						(189)
Souris <i>Cd36</i> ^{-/-}	×						×	(190, 191)
Souris <i>Best1</i> ^{Cre} <i>Abca1</i> ^{ff} ; <i>Abcg1</i> ^{ff}			×			×	×	(192)
Autres								
Souris de sénescence accélérée	×	×						(193)
Souris <i>Best1</i> ^{Cre} <i>Dicer1</i> ^{ff}			×					(194)
Souris transgénique <i>mcd/mcd</i>	×	×	×	×			×	(26)
Souris <i>Itgb5</i> ^{-/-}							×	(27)
Souris <i>Best1</i> ^{Cre} <i>Rb1cc1</i> ^{ff}		×	×	×	×	×	×	(195)
Souris <i>Best1-rtTA</i> ^{Cre} <i>Atg5</i> or <i>Atg7</i> ^{ff}			×				×	(141)

1.1.8. Les stratégies thérapeutiques actuelles de la préservation du RPE et des photorécepteurs

À ce jour, il n'y a aucun traitement curatif approuvé pour la DMLA de forme sèche. Des suppléments d'antioxydants (vitamine C et E, lutéine, zéaxanthine), de zinc et de cuivre sont suggérés pour ralentir sa progression. Cependant, la supplémentation en antioxydants est efficace pour ralentir la progression de la maladie seulement à des stades avancés et ne prévient pas la maladie (196-198). La régénération du RPE par les cellules souches est prometteuse pour les patients qui sont à des stades avancés aussi. Il y a donc un besoin urgent pour des traitements qui pourraient prévenir ou ralentir la progression de la DMLA de forme sèche à des stades précoces. Les stratégies des agents pharmacologiques qui ont été ou qui sont en investigation incluent la modulation du stress oxydatif, l'amélioration de la perfusion choroïdienne, la neuroprotection, la réduction de métabolites toxiques (anti- β -amyloïde), la modulation du cycle visuel (diminution de l'accumulation de l'A2E et de la lipofuscine), la suppression de l'inflammation et l'amélioration de la fonction mitochondriale (199, 200).

1.2. Le CD36

Depuis sa découverte, le récepteur éboueur *cluster of differentiation 36* (CD36, aussi appelé *fatty acid translocase* ou *scavenger receptor class B type 2*) a suscité beaucoup d'intérêt en raison de son caractère multiligand. Son expression dans une vaste diversité de tissus

témoigne les multiples fonctions physiologiques du CD36. Étant impliqué dans de nombreuses conditions pathologiques à caractère métabolique et inflammatoire, le CD36 est une cible thérapeutique intéressante (201, 202).

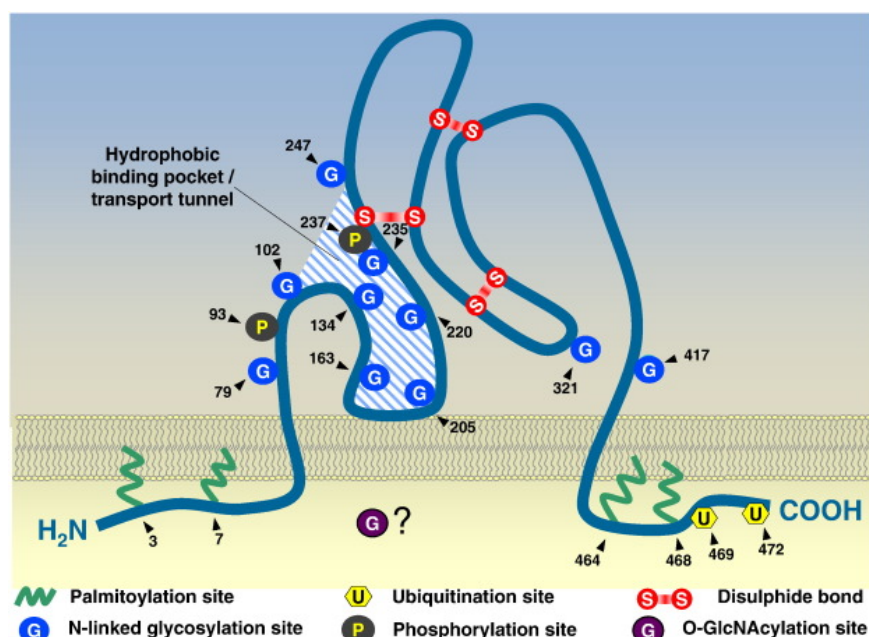
1.2.1. Le CD36, un récepteur multiligand

Le CD36 est une protéine transmembranaire de 88 kDa qui est hautement glycosylée (203, 204). Il partage une structure similaire avec les autres membres de la famille des récepteurs éboueurs de classe B, le *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1) et *lysosomal integral membrane protein-2* (LIMP2), soit une large boucle extracellulaire avec deux domaines transmembranaires et les deux extrémités terminales se situant dans le cytoplasme (205). Il contient plusieurs sites de modifications post-traductionnelles qui régulent, entre autres, sa distribution cellulaire (206) (Figure 4).

Le CD36 a plusieurs ligands lipidiques et protéiques. Les acides gras à longues chaînes (207), les phospholipides (208, 209), la LDLox (210), la thrombospondine-1 (TSP-1) (211), le peptide β -amyloïde (212), la phosphatidylsérine des cellules apoptotiques (213) et les AGEs (214) sont des exemples de ligands endogènes. Le CD36 reconnaît aussi des composantes spécifiques de la paroi bactérienne et joue un rôle important dans la défense contre les agressions pathogènes (215-217).

Le CD36 est présent non seulement à la surface des cellules, mais aussi au niveau de l'endosome, du réticulum endoplasmique (ER) et de la mitochondrie (218). Au niveau de la membrane plasmique, le CD36 est généralement présent dans les microdomaines riches en cholestérol (*lipid rafts*), dans lesquels il peut former des associations fonctionnelles avec d'autres protéines comme la cavéoline-1. Il a été suggéré que ces interactions protéine-protéine permettent la stabilisation du CD36 à la membrane (219). En absence de ligands, les récepteurs CD36 se trouvent dans des *nanoclusters* préformés, ce qui semble faciliter la liaison avec ses ligands multivalents (p. ex. LDLox) et l'activation des voies de signalisation une fois qu'ils sont liés aux ligands (220, 221). La liaison d'un ligand au CD36 initie l'internalisation du complexe CD36-ligand ou la phagocytose. La signalisation intracellulaire activée par les ligands du CD36 est dépendante du contexte cellulaire (202).

Figure 4. Représentation schématique de la topologie putative du CD36 et des modifications post-traductionnelles connues



Le CD36 possède 2 domaines transmembranaires, avec ses petites extrémités cytoplasmiques étant palmitoylées. Le carboxyterminal contient aussi 2 sites d'ubiquitination. La grande boucle extracellulaire contient 10 sites de N-glycosylation et deux sites de phosphorylations. La localisation du site O-GlcNAcylation n'est pas encore connue. Les liaisons disulfures entre les cystéines extracellulaires sont montrées. La région ombrée désigne la poche hydrophobe qui est impliquée dans la liaison au ligand et qui sert de tunnel par lequel les ligands sont livrés de l'espace extracellulaire au feuillet externe de la bicouche de phospholipides membranaires. Les flèches et les nombres indiquent les résidus d'acides aminés approximatifs. Tirée de (206).

1.2.2. Les fonctions physiologiques du CD36

Le CD36 a initialement été identifié sur la membrane des plaquettes vers la fin des années 70 (222). Des années plus tard, il a été découvert comme étant identique à la protéine membranaire des monocytes/macrophages qui est reconnue par l'anticorps monoclonal OKM5 (203, 223). Le CD36 est également présent sur d'autres phagocytes professionnels, les microglies et les cellules dendritiques, chez lesquels il agit comme médiateur de l'inflammation. Il est exprimé chez les cellules endothéliales où il joue un rôle dans l'angiogenèse. Plusieurs types cellulaires impliqués dans le stockage et l'utilisation d'énergie comme les adipocytes, les hépatocytes et des myocytes expriment le CD36. Il régule de cette façon l'homéostasie lipidique

et la balance énergétique. Le CD36 joue un rôle dans la perception des acides gras à longues chaînes chez les neurones gustatifs et dans l'hypothalamus ventromédian. Finalement, certaines cellules épithéliales spécialisées comme celles du RPE expriment également le CD36 (201). Quelques fonctions pertinentes dans le contexte de la DMLA seront décrites ci-dessous.

1.2.2.1. Le métabolisme lipidique et la balance énergétique

Les acides gras à longues chaînes servent de source pour générer l'énergie cellulaire. Le CD36 en tant que translocase d'acides gras facilite le transport d'acides gras à longue chaîne vers l'intérieur de la cellule. Il joue un rôle dans de multiples aspects du métabolisme des acides gras incluant la perception gustative des lipides, l'absorption intestinale et l'utilisation des acides gras par les muscles et les tissus adipeux (224).

À court terme, le recyclage vésiculaire du CD36 entre l'endosome et la membrane plasmique régule le taux d'internalisation d'acides gras par les cellules (218, 225). À long terme, l'augmentation transcriptionnelle de l'expression du CD36 semble accroître l'internalisation et l'utilisation des acides gras par les tissus. L'expression du *CD36* est contrôlée par la famille des facteurs de transcription *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) de façon tissu-dépendant. Les acides gras, les acides gras oxydés, les métabolites d'acides gras comme les esters d'acyl-CoA et les écosanoïdes servent d'agonistes des PPARs et résultent en la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'utilisation des acides gras, notamment dans leur β -oxydation. Le *CD36* est à son tour un gène cible des PPARs (224). L'activation du CD36 peut augmenter l'activité du PPAR γ indépendamment de l'internalisation de lipides. L'activation du CD36 par l'EP80317, un ligand peptidique, mène à l'augmentation de la production du 15d-PGJ₂ qui est un agoniste du PPAR γ (226).

Les souris *Cd36*^{-/-} présentent un niveau de lipides plasmatiques élevé et une hypoglycémie qui est attribuable à une diminution de la capture des acides gras par les muscles cardiaques et squelettiques et les tissus adipeux (227). Plusieurs études ont suggéré une contribution de la capture des lipides par le CD36 dans le développement de syndromes métaboliques comme l'obésité (228, 229), la résistance à l'insuline (230, 231) et la stéatose

hépatique non alcoolique (232, 233). Le CD36 a été extensivement étudié dans l'athérosclérose : par sa capacité à lier et à internaliser les lipoprotéines modifiées (p.ex. LDLox), il contribue à l'accumulation de lipides chez les macrophages et à la formation subséquente de cellules spumeuses (234), ainsi qu'à l'inflammation (235).

1.2.2.2. L'inflammation

Les *pathogen recognition receptors* (PRRs) sont des récepteurs qui reconnaissent les signaux de danger endogènes (*danger-associated molecular patterns* ou DAMPs) et exogènes (*pathogen-associated molecular patterns* ou PAMPs) et, par conséquent, activent une cascade de signalisation intracellulaire, suivi d'une réponse inflammatoire. Les TLRs sont une famille de PRRs qui reconnaissent de nombreux ligands d'origine bactérienne, virale, protozoaire et fongique (236). Le CD36 est connu comme étant un co-récepteur des complexes hétérodimériques des TLRs en aidant la reconnaissance de certains PAMPs et DAMPs. Il agit comme co-récepteur de l'hétérodimère TLR2-TLR6 pour la reconnaissance de certains motifs du *Staphylococcus aureus* par les macrophages (216, 217). Il est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'inflammasome induites par l'hétérodimères TLR4-TLR6 en réponse au LDLox et au peptide β -amyloïde (237, 238). Il participe de cette façon à l'inflammation stérile dans des maladies comme l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer. La phagocytose des pathogènes (215) et des cellules apoptotiques (213) est également une fonction importante du CD36 dans l'inflammation.

Le CD36 régule également l'inflammation en tant que récepteur du *CD5 molecule like* (CD5L ou *apoptosis inhibitor of macrophage*) (239). Le CD5L est une protéine soluble dont l'expression est régulée de façon transcriptionnelle par le *Liver X receptor alpha* (LXR α) (240). Il a été découvert en 1997 en tant que protéine sécrétée par les macrophages (241), mais il est également exprimé par d'autres cellules et se trouve en grande quantité (de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$) dans le plasma (242) de façon liée aux immunoglobulines de type M (IgM) (243). Son expression est augmentée lors de certaines infections (244) et dans des pathologies à caractère métabolique comme l'athérosclérose (au niveau des cellules spumeuses) (245) et l'obésité chez la souris (243). Les effets du CD5L sont dépendants du contexte et du type cellulaire. Il inhibe

l'apoptose des macrophages exposés au LDLox et augmente l'internalisation de LDLox, ce qui peut promouvoir la progression de l'athérosclérose (245, 246). Il diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par les TLRs et augmente à la place celle de l'interleukine 10 (IL-10) en stimulant l'autophagie (247), augmente la capacité phagocytaire (248) et mycobactéricide (249) des macrophages et promeut l'inflammation dans l'obésité par l'augmentation de l'efflux d'acides gras par les adipocytes (250).

1.2.2.3. L'angiogenèse

En tant que récepteur de la TSP-1, le CD36 est un régulateur négatif de l'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales de la microvasculature. Il inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF et cause à la place l'apoptose médiée par la caspase 3 (251).

1.2.3. Le rôle du CD36 chez le RPE

Dans la rétine de primate, l'expression du CD36 est détectable par immunohistochimie au niveau des choriocapillaires, du RPE, des segments internes des photorécepteurs, de la couche plexiforme externe et de la couche de cellules ganglionnaires (252). Houssier et coll. ont observé que le CD36 chez les cellules du RPE est exprimé majoritairement du côté basal chez la souris (191). Il est également connu que les microglies résidentes et les macrophages qui s'infiltrant en condition pathologique expriment le CD36 (201).

Trois récepteurs sont connus comme étant impliqués dans la phagocytose des POS : l'intégrine $\alpha_v\beta_5$, le *Mer tyrosine kinase* (MerTK) et le CD36. Il a été proposé que ces trois récepteurs coordonnent ensemble la phagocytose des POS par le RPE. Les souris déficientes en MerTK (25), en intégrine $\alpha_v\beta_5$ (27) ou en CD36 (191) présentent toutes une dégénérescence rétinienne, ce qui montre l'importance de l'activité phagocytaire du RPE dans l'homéostasie rétinienne. L'intégrine $\alpha_v\beta_5$ est nécessaire à la liaison des POS, ce qui active une voie de signalisation, et régule l'initiation de la phagocytose en suivant le cycle circadien. Suite à cette liaison des POS, le MerTK est activé et induit l'internalisation des POS (253). Le rôle du CD36

dans la phagocytose des POS par le RPE a initialement été démontré par Ryeom et coll. en 1996. Le groupe a observé que des anticorps contre le CD36 diminuent l'internalisation des POS par les cellules du RPE en culture. Ce même groupe a également démontré que la transfection d'une lignée de mélanome humaine par le *CD36* lui confère la capacité d'internaliser les POS (254). Cependant, Sun *et al.* ont démontré plus tard que les cellules du RPE de souris *Cd36*^{-/-} ont une capacité phagocytaire similaire à celles de souris de type sauvage (255). Le CD36 serait donc suffisant, mais non nécessaire à la phagocytose des POS. Curieusement, Finnemann et coll. ont observé que des IgG anti-CD36 bivalents accélèrent la phagocytose des POS par les cellules du RPE alors que des fragments Fab monovalents l'inhibent. De plus, lorsque la phagocytose est inhibée par des anticorps contre l'intégrine $\alpha_v\beta_5$, la présence d'anticorps contre le CD36 accélère la phagocytose des POS déjà liés à la cellule (146). Ces données suggèrent une fonction modulatrice du CD36 sur la cinétique d'internalisation des POS. Les auteurs de ces études ont proposé que la liaison des POS au CD36 servirait peut-être comme signal « *eat-me* » pour accélérer la phagocytose. Les POS sont riches en lipides insaturés, surtout en DHA qui peuvent subir l'oxydation. Sun et coll. ont observé que les phosphatidylcholines oxydées dérivées du DHA servent de ligands pour le CD36. Le CD36 est donc possiblement impliqué dans l'augmentation de la phagocytose des POS en réponse aux dommages causés par la photo-oxydation (255). Les Rats Hypertensifs Spontanés (SHR) qui présentent plusieurs mutations au niveau du *Cd36* ont une sensibilité accrue aux dommages rétiens induits par la lumière (256), ce qui supporte l'hypothèse émise par Sun et coll.

En 2010, une étude menée au laboratoire du Dr. Ong a montré que le CD36 participe à l'internalisation de LDLox par le RPE chez la souris. Premièrement, la souris déficiente en *Cd36* présente une accumulation de LDLox dans la région sous-rétinienne. Deuxièmement, nous avons observé une accumulation de LDLox dans le RPE suite à l'administration systémique de LDLox couplé à un fluorophore chez la souris *Cd36*^{+/+}, mais pas chez la souris *Cd36*^{-/-}. Troisièmement, l'internalisation de LDLox par les cellules du RPE de souris *Cd36*^{-/-} en culture était presque absente. La déficience en *Cd36* chez la souris était également associée à un épaississement de la membrane de Bruch, ce qui suggérerait que le CD36 joue un rôle important dans la clairance de lipides de la région sous-rétinienne (190).

Malgré que le CD36 soit le récepteur de la TSP-1 qui régule de façon négative l'angiogenèse, la souris déficiente en *Cd36* et le rat SHR développent une atrophie choroïdienne. La phagocytose des POS par le RPE stimule l'expression de plusieurs gènes, dont le *prostaglandin endoperoxide synthase 2* (*PTGS2*, aussi connu sous le nom de cyclo-oxygénase 2) qui contrôle la production du VEGF. Houssier et coll. ont observé que l'expression protéique du *PTGS2* et du *VEGF* est réduite chez la souris déficiente en *Cd36* et le rat SHR. Notamment, l'augmentation transcriptionnelle de l'expression du *Ptgs2* et du *Vegf* suite à la phagocytose des POS était moindre chez les cellules du RPE du rat SHR que chez celles du rat Wistar. Ces données démontrent que le CD36 est nécessaire à l'induction de l'expression du *PTGS2* et la production subséquente du VEGF suite à la phagocytose des POS. De plus, la stimulation du CD36 par un anticorps était suffisante pour induire une augmentation de l'expression du *Ptgs2* (191).

1.3 Les ligands sélectifs du CD36 analogues du GHRP-6

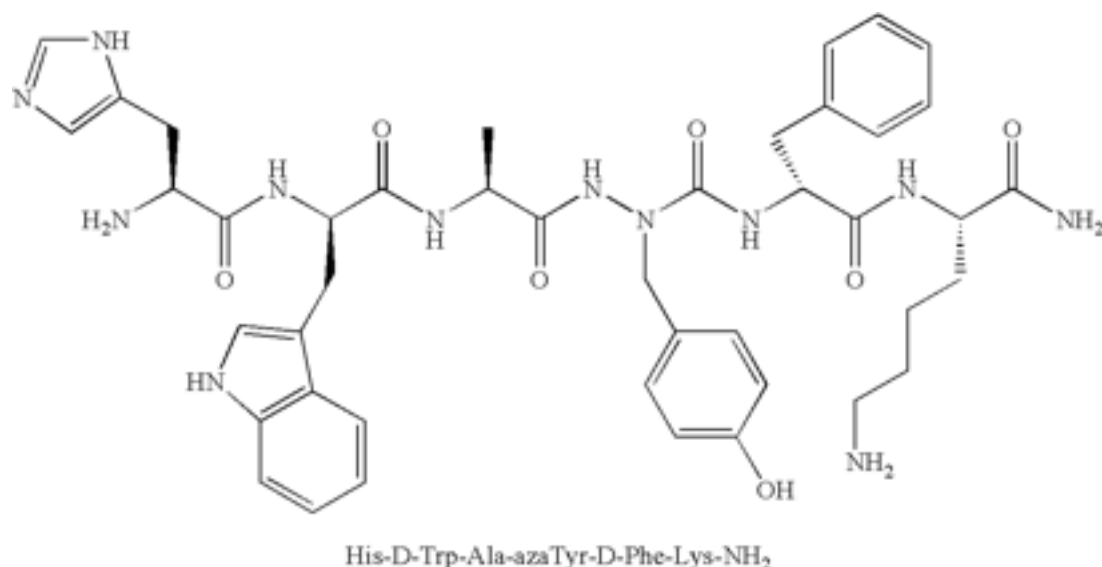
1.3.1. Des GHRPs aux azapeptides

Les *growth hormone-releasing peptides* (GHRPs) sont de petits peptides synthétiques dérivés de la méthionine-enképhaline. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1976 par Bowers alors qu'il était à la recherche de composés pouvant stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance tout en étant dépourvus d'activité opiacée (257). Dès lors, d'autres analogues peptidiques ont été synthétisés, incluant l'hexaréline (His-d-2MeTrp-Ala-Trp-d-Phe-Lys-NH₂) qui est un analogue du GHRP-6 (His-d-Trp-Ala-Trp-d-Phe-Lys-NH₂) métaboliquement plus stable que les autres GHRPs (258). Comme les autres GHRPs, l'hexaréline stimule la sécrétion de l'hormone de croissance en liant le *growth hormone secretagogue receptor type 1a* (GHS-R1a), mais il a aussi été observé comme ayant des effets sur le système cardiovasculaire. En 2002, Bodart et coll. ont découvert que la liaison de l'hexaréline sur le CD36 est responsable de ses effets vasculaires (259). Des études ultérieures ont démontré que l'hexaréline se lie au CD36 à un domaine qui chevauche le site de liaison des LDLox (260), et qu'il a un effet anti-athérosclérotique (261). L'EP80317 (Haic-D-Mrp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), un analogue

des GHRPs avec une structure similaire à l'hexaréline, mais qui se lie sélectivement au CD36, a aussi démontré des effets anti-athérosclérotiques (262).

Les azapeptides sont des analogues de peptides dans lesquels un ou plusieurs acides aminés sont remplacés par un N-aminourée. La substitution d'un centre α -carbone par un groupement azoté crée une contrainte de conformation, repliant l'analogue peptidique. Les azapeptides en tant qu'agents pharmacologiques ont en général des avantages pharmacodynamiques et pharmacocinétiques avec une sélectivité plus élevée, une durée d'action prolongée et une meilleure stabilité métabolique (263). Des séries d'azapeptides ont été synthétisées à partir des GHRPs dans le but de cibler le CD36 dans le traitement de diverses pathologies (264). Le MPE-001 (His-d-Trp-Ala-azaTyr-d-Phe-Lys-NH₂), un azapeptide qui a une meilleure sélectivité pour le CD36 que l'EP80317 et une meilleure affinité que les autres azapeptides (265), fait l'objet de la présente étude. Sa structure est présentée à la figure 5.

Figure 5 : Structure du MPE-001



Tiré de (266).

1.3.2. Le potentiel thérapeutique des ligands du CD36 dans la DMLA : les évidences actuelles

Plusieurs évidences nous incitent à croire que le CD36 serait une cible intéressante dans le traitement de la DMLA, la plus grande évidence étant que la déficience du *Cd36* chez la souris cause une accumulation de dépôts sous-rétiniens et une dégénérescence rétinienne (191). Des ligands naturels du CD36 s'accumulent dans la rétine des patients qui ont la DMLA, dont plusieurs qui promeuvent l'inflammation ou qui sont cytotoxiques. Les β -amyloïdes (93), les LDLox (94), les AGEs (267) et les cellules apoptotiques (268) en sont des exemples. Il ne serait donc pas surprenant que le CD36 participe dans l'inflammation et l'homéostasie lipidique dans la rétine en condition pathologique.

Deux de nos études antérieures effectuées chez la souris supportent l'effet thérapeutique potentiel des ligands du CD36 analogues du GHRP-6 dans la DMLA de forme sèche. La première étude est celle de Picard *et al.* dans laquelle il a été démontré que l'EP80317 (administré par injections sous-cutanées) diminue l'épaississement de la membrane de Bruch et préserve la fonction des photorécepteurs mesurée par l'électrorétinographie de la souris *apoe*^{-/-} soumise à une diète riche en gras (190). La deuxième étude est celle de Turcotte et coll. qui ont

démontré que les ligands azapeptidiques du CD36 (administré par injections sous-cutanées) diminuent l'accumulation de phagocytes mononucléaires activés marqués par le *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1) dans l'espace sous-rétinien de la souris *apoe*^{-/-} soumise à un stress photooxydatif par exposition à la lumière bleue. Cet effet était associé à une diminution de la sécrétion de cytokines et de la production d'oxyde nitrique par les macrophages J774 stimulés par le *(R)-fibroblast-stimulating lipopeptide 1* (R-FSL 1), un agoniste du TLR2, en présence de l'azapeptide MPE-001. Cet effet modulateur sur la sécrétion des cytokines proinflammatoires a également été observé avec les macrophages péritonéaux de souris polarisés en phénotype pro-inflammatoire M1, suggérant le caractère immunomodulateur de cet azapeptide (269).

Nous avons précédemment démontré que l'EP80317 diminue l'internalisation de LDLox et promeut l'efflux du cholestérol chez les macrophages. L'augmentation de l'efflux était dépendant du PTGS2 et du PPAR γ . Une augmentation de l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 impliqués dans le transfert du cholestérol dans la genèse des lipoprotéines de haute densité (HDL) a également été observée (226, 262). Les cellules du RPE de patients qui ont la DMLA présentent une augmentation de gouttelettes lipidiques (137), ce qui a incité Storti et coll. à proposer que l'efflux du cholestérol est important pour les cellules du RPE qui phagocytent une grande quantité de lipides contenus dans les POS et qu'un défaut dans cet efflux pourrait contribuer au développement de la DMLA. En générant des souris qui sont déficientes en *abca1* et *abcg1* spécifiquement au niveau du RPE, le groupe a démontré que l'absence de ces transporteurs du cholestérol cause une dégénérescence rétinienne (192). Il n'est malheureusement pas encore connu si le CD36 régule de quelque façon l'efflux du cholestérol par les cellules du RPE.

Comme mentionné plus haut, le CD36 joue un rôle dans la régulation de l'angiogenèse. Certains azapeptides analogues du GHRP-6 ont un effet proangiogénique (265). Le MPE-001, au contraire, a été démontré comme étant un inhibiteur de l'angiogenèse (265, 269). Un effet proangiogénique serait néfaste dans le contexte de la DMLA de forme humide, alors qu'un effet anti-angiogénique serait bénéfique dans ce contexte, mais pourrait potentiellement aggraver l'atrophie géographique. Dans le but de générer des ligands du CD36 avec une activité immunomodulatrice mais qui n'affectent pas l'angiogenèse, des azasulfurylpeptides analogues

du GHRP-6 ont été synthétisés. En utilisant des explants choroïdiens, il a été observé que le His-D-Trp-Ala-(4-F)AsF-D-Phe-Lys-NH₂ affecte peu l'angiogenèse avec un effet encore plus prononcé que le MPE-001 dans la modulation de l'inflammation induite par les macrophages (269).

La modulation du stress oxydatif pour préserver la fonctionnalité et augmenter la survie des cellules du RPE figure parmi les stratégies proposées pour le traitement de la DMLA de forme sèche. Malgré qu'il soit connu comme un récepteur de phospholipides et de lipoprotéines oxydés, nul ne sait si le CD36 a un rôle à jouer dans la modulation du stress oxydatif. Cependant, le niveau d'expression du CD36 est associé au statut redox dans plusieurs contextes pathologiques. Chez la souris *Cd36*^{-/-}, la génération de ROS durant l'ischémie cérébrale est beaucoup moins élevée que chez la souris de type sauvage. L'expression du *Cd36* est augmentée lors d'une ischémie cérébrale et le traitement par antioxydant diminue cette induction de l'expression du *Cd36* (270). Cho et coll. ont démontré que le peptide antioxydant SS31 empêche le stress oxydatif lors de l'ischémie-reperfusion cérébrale de façon dépendante du CD36 (271). Le traitement intraveineux de la souris avec le ligand du CD36 CP-3 diminue la production de ROS après l'ischémie-reperfusion coronaire (272). Chez le RPE, il y a une corrélation entre l'expression du CD36 (ARNm, protéine et expression à la surface de la cellule) et les ROS induits par l'hypoxie. La diminution du ROS ou l'inhibition de la peroxydation des lipides bloquent l'augmentation de l'expression du CD36 induite par l'hypoxie (273).

2. Hypothèse de travail et objectifs

Bien que nous ayons précédemment démontré l'effet protecteur des ligands du CD36 analogues du GHRP-6 contre la dégénérescence rétinienne des souris *ApoE*^{-/-} soumises à une diète riche en gras et en cholestérol (190), nous n'avons jamais vérifié si ces ligands du CD36 exercent un effet protecteur contre le stress oxydatif sur le RPE. Pour cette raison, nous avons émis l'hypothèse et les objectifs suivants.

Hypothèse

Notre hypothèse est que les azapeptides ligands du CD36 protègent les cellules du RPE contre le stress oxydatif.

Objectifs

- 1) Évaluer l'effet antioxydant et cytoprotecteur du MPE-001 sur les cellules du RPE exposées au stress oxydatif,
- 2) Élucider le mécanisme par lequel le MPE-001 exerce son effet antioxydant,
- 3) Vérifier l'interférence du MPE-001 sur l'activité phagocytaire des cellules du RPE.

3. Manuscrit

Le manuscrit suivant sera soumis pour publication dans le journal Redox Biology.

The CD36 ligand MPE-001 protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress through autophagy enhancement

Marie-France Dorion¹, Mukundila Mulumba¹, Shuya Kasai², Ken Itoh², William D. Lubell³, Huy Ong^{1,*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, 2940 Chemin de Polytechnique, Montreal (QC) H3T 1J4, Canada

²Department of Stress Response Science, Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036-8562, Japan,

³Department of Chemistry, Université de Montréal, 2900 boulevard Édouard Montpetit, Montreal (QC) H3T 1J4, Canada

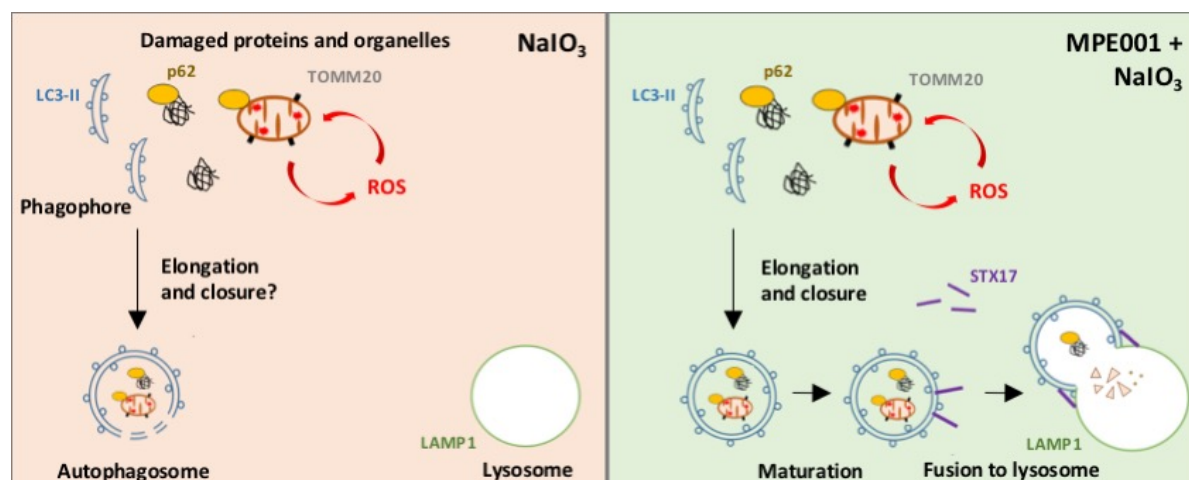
*Corresponding author. e-mail address: huy.ong@umontreal.ca

Abstract

Oxidative damages to the retinal pigment epithelium (RPE) that maintains photoreceptor integrity play a central role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Our previous study revealed a photoreceptor-preserving effect of CD36 ligands in a mouse model of AMD. Their effect on the RPE, however, remained to be elucidated. The present study aimed to investigate the cytoprotective effect of the CD36 ligand MPE-001 in RPE cells exposed to oxidative stress. Oxidative stress was induced in the human cell line hTERT RPE-1 using NaIO₃. MPE-001 was observed to decrease NaIO₃-induced reactive oxygen species formation and apoptosis, with no transcriptional effect on antioxidant enzymes. Immunoblotting and immunostaining showed that NaIO₃ disrupts autophagic flux while MPE-001 restores it. This

effect of MPE-001 was associated with an increase in STX17-positive mature autophagosomes. The effect of MPE-001 on cellular viability and NaIO₃-induced mitochondrial superoxide formation was completely abolished by the autophagy inhibitors wortmannin and/or bafilomycin A1. In conclusion, we report for the first time that a CD36 ligand confers protection to RPE cells under oxidative stress through the improvement of autophagic process.

Graphical abstract



Keywords: CD36, age-related macular degeneration, retinal pigment epithelium, oxidative stress, autophagy

Highlights

- The CD36 ligand MPE-001 protected RPE cells from NaIO₃-induced cytotoxicity.
- NaIO₃ inhibited autophagic flux and MPE-001 restored it.
- Targeting CD36 might be a promising strategy in preserving RPE integrity in dry AMD.

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of visual impairment in the elderly population (1). It is categorized into two forms depending on the pathophysiological features: the wet (or neovascular) form and the dry (also termed atrophic or non-neovascular)

form. Some hallmarks of dry AMD are accumulation of drusen, complex lipidic and proteic deposits, abnormality of the retinal pigment epithelium (RPE) and atrophy of the photoreceptor layer in the macular region of the retina (2). Although efficient treatments are available for the wet form, there is no cure or treatment that can prevent dry AMD (3).

The RPE is a monolayer of polarized epithelial cells located posterior to and in very intimate contact with photoreceptors. It is responsible for the maintenance of photoreceptors through daily phagocytosis of shed photoreceptor outer segments (POS). Oxidative stress and inflammation are two insults that are thought to cause RPE dysfunction and loss that precede photoreceptor degeneration in dry AMD. The RPE is prone to oxidative stress due to 1) constant exposure to photo-oxidative light, 2) a highly oxygenated environment and 3) its high metabolic activity (2). Increased mitochondrial DNA damage (4) and expression of antioxidant enzymes (5) have been observed in the eyes of AMD patients. Smoking as a risk factor of AMD (6) and development of AMD-like phenotype in *Sod1*- (7) or *Nfe2l2*- (8) deficient or *Sod2* knockdown (9) mice also support a role for oxidative stress in the pathogenesis of AMD.

One of the adaptive mechanisms that protect the cell against oxidative damages is autophagy. It involves the formation of specialized vesicles (autophagosomes) that engulf and target damaged proteins and organelles to lysosomal degradation. Following autophagy initiation, phagophore elongates to sequester cargo and closes to form a mature autophagosome, which will then fuse with lysosomes (10). It is increasingly evident that autophagy malfunction is involved in the pathogenesis of AMD. RPE cells from AMD donors were shown to have a decreased autophagic flux and an increased susceptibility to oxidative damages (11). Moreover, RPE-specific deficiency in autophagy-related 5 or 7 (*Atg5* or *Atg7*) leads to retinal degeneration in mice (12).

CD36 is a scavenger receptor first identified as a transporter of fatty acids into the cell. Most commonly known for its role in the innate immune response and lipid homeostasis, it is expressed in diverse cell types including RPE cells (13). Endogenous ligands of CD36 are known to accumulate within the retina in AMD, several of which promote inflammation. Those include β -amyloids (14), oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) (15), advanced glycation end products (16) and apoptotic cells (17). In addition, we previously reported that CD36 mediates the clearance of subretinal deposits in mice (18), suggesting its involvement in lipid handling in the diseased retina. EP80317, a derivative of growth hormone-releasing peptide-6

(GHRP-6) and a selective ligand of CD36, has been shown to preserve photoreceptor function in *Apoe*^{-/-} mice fed with high fat high cholesterol diet (18). More recently, it was observed that azapeptide derivatives of GHRP-6 diminish the infiltration of immune cells into the subretinal space of *Apoe*^{-/-} mice under photo-oxidative stress (19). However, the potential effect of these unique synthetic CD36 ligands in RPE protection from oxidative stress has yet to be documented. In the present study, we explored the cytoprotective effect of the novel CD36 ligand azapeptide MPE-001 on a human RPE cell line exposed to oxidative stress, with a focus on the unexpected role of autophagy in mediating this effect.

Materials and methods

hTERT RPE-1 culture and treatments

hTERT RPE-1 (CRL-4000; American Type Cell Collection) cells were cultured in DMEM/Ham's F12 (Wisent Bio Products) with 10% FBS (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Wisent Bio Products). Cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Cells of passage 8 to 18 were used. After each passage by trypsinization, cells were incubated for at least 48 hours and until 90-100% confluence before treatments, unless otherwise specified. Sodium iodate (NaIO₃) was purchased from Wako Pure Chemical Industries and was freshly diluted in complete media before each experiment. N-acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Sigma Aldrich and was also freshly diluted in complete media before experiments. pH of NAC-containing media was adjusted back to its original pH using NaOH. Bafilomycin A1, wortmannin and cytochalasin D were purchased from Sigma Aldrich, MitoParaquat (MitoPQ), MitoTEMPO and Mitoquinol (MitoQ) were from Cayman Chemical and trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP) was from Agilent Technologies.

Reactive oxygen species (ROS) detection

CM-H₂DCFDA and MitoSOX Red (Invitrogen) were used to assess total cellular ROS and mitochondrial superoxide formation, respectively. Cells in a black 96-well plate were incubated with 10 μ M CM-H₂DCFDA for 30 minutes or with 2.5 μ M MitoSOX Red for 15 minutes in phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C. Fluorescence intensity (excitation/emission = 495/525 for CM-H₂DCFDA and 510/580 for MitoSOX Red) was measured using Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments). When normalization to cell number was required, cells were additionally stained with Hoechst 33342 (1 μ g/mL for 10 minutes; Thermo Scientific). At least 5 image acquisitions per well were carried out using CQ1 confocal quantitative image cytometer (Yokogawa Electric Corporation) to determine fluorescence intensity per cell. All conditions were analyzed at least in triplicates.

Viability assay and lactate dehydrogenase (LDH) release

2 500 cells and 5 000 cells per well were seeded in a 96-well plate, cultured for 48 hours, treated and assessed for viability (Cell Counting Kit-8, CCK-8; Dojindo Molecular Technologies) and LDH release (LDH assay kit; Dojindo Molecular Technologies), respectively. Both assays were carried out following manufacturer's protocols. All conditions were analyzed at least in triplicates.

For the assessment of viability following low concentration NaIO₃ treatments (1, 2.5 and 5 mM), 2 000 cells per well seeded in a black 96-well plate were cultured for 48 hours and then treated daily for 72 hours. Images acquisition and nuclei count (Hoechst 33342) in 3 to 5 areas per well was carried out using CQ1 confocal quantitative image cytometer. All conditions were analyzed at least in triplicates.

Caspase 3/7 activity

Cells in a black 96-well plate were incubated for 30 minutes at 37 °C with 5 μ M CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen) in PBS with 5% FBS, and then with Hoechst 33342. Image acquisitions and analysis were carried out using CQ1 confocal

quantitative image cytometer. Proportion of cells with active caspase 3/7 was determined in 5 areas per well. All conditions were analyzed at least in triplicate.

Mitochondrial membrane potential

Mitochondrial depolarization was assessed using JC-1 dye (Invitrogen). 5 000 cells per well were seeded and cultured for 48 hours in a black 96-well plate. Cells were treated and incubated for 20 minutes with 2.5 µg/mL of JC-1 dye in serum-free media. Fluorescence intensity was measured using Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, and red (excitation/emission = 535/590) to green (excitation/emission = 485/530) fluorescence intensity ratio was determined. All conditions were analyzed at least in triplicates. Cells were additionally stained with Hoechst 33342 for imaging purpose. Images were obtained using Zeiss Axio Observer.

RNA interference

1 500 cells per well were seeded overnight in a 96-well plate. Cells were then transfected with either ON-TARGET plus Human CD36 (948) siRNA – SMART pool or siGENOME RISC-Free Control (Dharmacon) using INTERFERin siRNA/miRNA Transfection Reagent (final concentration of 0.15%; Polyplus-Transfection). All procedures were carried out following manufacturer's recommendations. Knockdown efficiency was assessed by qRT-PCR as described in the next section using *GAPDH* and *YWHAZ* as endogenous controls.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) with some modifications to the recommended protocol. Briefly, cells in a 6-well plate were washed with ice cold PBS and lysed with Ribozol RNA Extraction Reagent (VWR Life Science). One third volume of chloroform (Sigma-Aldrich) was added and mixed vigorously. Lysates were centrifuged at 10 000 g for 18 minutes at 4 °C. The aqueous phase supernatant was isolated and mixed with isopropanol. The

mixture was transferred to RNeasy columns, sequentially washed using reagents provided by the manufacturers (RW1 and RPE buffers) and finally eluted in water. RNA samples were sent to the genomic platform of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Canada for qRT-PCR. Results were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with *YWHAZ* and *PPIA* as endogenous controls. Primers' sequences are as shown in Table 1.

Murine primary RPE isolation and culture

Animals were housed in the local animal facility and maintained under a 12/12 hours light/dark cycle. All experiments involving the use of animals were approved by the institutional ethic comity and carried out in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for the use of experimental animals.

Murine RPE cells were isolated as previously described in rats (21). Eyes of C57BL/6 mice aged between 7 and 12 days were collected and left in complete media overnight at room temperature in dark. Eyes were washed and digested in Hank's balanced salt solution (HBSS; Wisent Bio Products) containing 2 mg/mL trypsin and collagenase D (Sigma-Aldrich) for 45 minutes. Eyes were then put back in complete media and opened up to isolate RPE cell sheets. Isolated RPE cells were plated on a 35 mm petri dish pre-coated with attachment factor (Cell Applications) and left untouched for 5 days. Cells were used at passage 2. All treatments and culture were done in DMEM/Ham's F12 with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere.

Western blot

Cells were washed with ice cold PBS and lyzed with RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 25 mM NaF, 5 mM EDTA with protease and phosphatase inhibitors; Pierce) for 30 minutes on ice. Cell lysates were centrifuged at 450 g for 30 minutes at 4°C and supernatants were retrieved.

Protein concentrations were determined by BCA assay (Pierce Biotechnology). Equal amounts of proteins were diluted in Laemmli buffer and boiled at 95°C for 5 minutes. Proteins

were separated on SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Laboratories) for immunoblotting. Membranes were blocked with Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST) containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour and incubated with primary antibodies (1:500 dilution; HMOX-1 #5061S, GAPDH #2118S, LC3B #2775S, all from Cell Signaling Technology; STX17 #PA5-40127 from Invitrogen) in blocking buffer at 4°C overnight. Following washes, blots were incubated for 1 hour with horse radish peroxidase (HRP) -conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 10 000; Jackson ImmunoResearch). Immunoblotted bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) with West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) using ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Image analysis was performed using ImageLab 5.2 software (Bio-Rad Laboratories).

Immunostaining

50 000 cells per chamber were cultured for 48 hours in poly-D-lysine-coated 4-well chamber slides (Corning). After treatments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 15 minutes at 37 °C, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 minutes and blocked with 3% normal goat serum in PBS for 30 minutes. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies at 1 : 200 dilution (p62 #sc-28359, Santa Cruz Biotechnology; LC3B #2775S, Cell Signalling Technology; STX17 #PA5-40127, Invitrogen; TOMM20 #H00009804-M01, Abnova). Following washes, cells were incubated with secondary antibodies for 1 hour (4 µg/mL; Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG from Invitrogen, PE/Cy5.5-conjugated goat anti-mouse IgG from Abcam) with Hoechst 33342 (1 µg/mL). When indicated, cells were transfected with CellLight™ Lysosomes-RFP, Bacmam 2.0 (Invitrogen) or Premo Autophagy Sensor LC3B-GFP, Bacmam 2.0 (Invitrogen) following manufacturer's instructions a day before treatments. p62 immunostaining was observed using KEYENCE Fluorescence Microscope BZ-X700. All other immunostainings were observed using Zeiss LSM 700 confocal microscope.

POS isolation and phagocytosis assay

Bovine eyes were obtained from a slaughterhouse. POS were isolated and labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) as previously described (22). Briefly, fresh bovine retinas were collected, homogenized and POS were purified using a sucrose gradient. Purified POS were washed and labelled with FITC. Cells in a black 96-well plate were challenged with FITC-labelled POS (10 POS particles/cell) in complete media. After the challenge, cells were washed once with PBS supplemented with 1 mM MgCl₂ and 0.2 mM CaCl₂ (PBS-CM), once with 0.4% trypan blue in PBS to quench extracellular fluorescence and twice again with PBS-CM. Fluorescence intensity (excitation/emission = 488/525) was measured using Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader. All conditions were analyzed at least in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). One-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparison test was performed. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). A p-value lower than 0.05 was considered statistically significant.

Results

NaIO₃ caused a concentration-dependent cytotoxicity on hTERT RPE-1 cells

hTERT RPE-1 is a human cell line of RPE cells transfected with a plasmid expressing the human telomerase reverse transcriptase subunit. It is known to express RPE-associated genes and is capable of phagocytosis, gets polarized and pigmented and undertake a polygonal morphology when terminally differentiated *in vitro* (22-24). We used the oxidant NaIO₃ to induce oxidative damages to hTERT RPE-1 cells. Increased cellular ROS formation was

observed in NaIO₃- (6.25, 12.5 and 25 mM) treated cells after 2 hours (Fig. 1A). Cellular viability assessed by CCK-8 was decreased (Fig. 1B) and LDH release was increased (Fig. 1C) after 24 hours of treatment. Increase in the percentage of cells positive for active caspase 3/7, suggestive of apoptosis, was also observed after 4 hours (Fig. 1D). These effects of NaIO₃ were all concentration-dependent.

MPE-001 had a protective effect on hTERT RPE-1 cells against NaIO₃-induced cytotoxicity

To evaluate the effect of the CD36 ligand MPE-001 on RPE cell damage induced by NaIO₃, cells were pretreated for 2 hours with MPE-001, and then co-treated with MPE-001 and NaIO₃. MPE-001 was first confirmed to improve the viability of hTERT RPE-1 cells treated with 6.25 and 12.5 mM NaIO₃ (Fig. 2A). A concentration of NaIO₃ of 12.5 mM was chosen for further experiments. MPE-001 co-treatment decreased NaIO₃-induced ROS formation (Fig. 2B). We failed to detect any effect of MPE-001 on NaIO₃-induced LDH release (Fig. 2C) but the percentage of cells positive for active caspase 3/7 was largely decreased (Fig. 2D, E). To confirm the effect of MPE-001 on apoptosis, we assessed the mitochondrial membrane potential which is disrupted during early apoptosis (25). JC-1 is a dye that yield a green fluorescence as monomers. Due to its cationic nature, JC-1 accumulates and forms aggregates in healthy mitochondria, thereby emitting a red fluorescence. As expected, a 4-hour treatment with FCCP caused a decrease in JC-1 red aggregates in all cells, indicative of mitochondrial depolarization. Apoptotic cells with loss of red fluorescence were visible following 4 hours of NaIO₃ treatment, whereas apoptotic cells were rarely seen upon MPE-001 and NaIO₃ co-treatment (Fig. 2F, G). Unmerged images of JC-1 staining are provided in Sup. Fig. 1.

To verify that the protective effect of MPE-001 is CD36-dependent, CD36 expression was knocked down by RNA interference. After 72 hours, CD36 siRNA decreased *CD36* mRNA expression by 88.00% (Fig. 2H) and completely abolished the cytoprotective effect of MPE-001 (Fig. 2I).

MPE-001's protective effect was sufficient to fully protect hTERT RPE-1 cells against chronic low concentration NaIO₃ treatment

In AMD pathogenesis, the contribution of oxidative stress is chronic and loss of RPE cells are only seen later in the course of the disease. To confirm the protective effect of MPE-001 in a closer-to-reality-context, hTERT RPE-1 cells were treated daily for 72 hours with low concentrations of NaIO₃ (1, 2.5 and 5 mM). In these conditions, nuclei count using Hoechst 33342 staining (Sup. Fig. 2A, D) was a better indicator of cellular viability than CCK-8 assay (Sup. Fig. 2B). Daily 1 mM NaIO₃ treatment was sufficient to induce a statistically significant decrease in cellular viability assessed by nuclei count after 72 hours. MPE-001 conferred full protection against NaIO₃ at this concentration (Sup. Fig. 2C).

MPE-001 had a protective effect on murine primary RPE cells against NaIO₃-induced cytotoxicity

The protective effect of MPE-001 was also assessed in a primary culture of murine RPE cells. Murine RPE cells showed a greater sensitivity to the cytotoxic effect of NaIO₃ (Sup. Fig. 3A) than hTERT RPE-1 cells. A concentration of 9.375 mM was therefore chosen for further experiments. MPE-001 had a protective effect on NaIO₃-treated murine RPE cells in a similar extent to what was observed in hTERT RPE-1 cells (Sup. Fig. 3B-C).

The protective effect of MPE-001 was not mediated by a transcriptional upregulation of antioxidant enzymes expression

To define the mechanism by which MPE-001 exerts an antioxidant effect, the effect of MPE-001 and/or NaIO₃ treatments on antioxidant enzymes expression was assessed. Treatments did not have any effect on the expression of *CAT*, *GPX1*, *SOD1*, *SOD2*, *PRDX3*, *PRDX5* and *TXN2*. A 4-hour treatment with NaIO₃ increased the expression of *HMOX1*, *NQO1*, *GCLM*,

PRDX1 and *TXNRD1*, all target genes of the transcription factor NRF2 (or NFE2L2). The expression of *NFE2L2* itself, a master regulator of the antioxidant system (26), was also increased. MPE-001 was not observed to affect the expression of *NFE2L2* or that of its target genes, even when protein expression of HMOX1 was assessed at different time points following NaIO₃ treatments (Fig 3A-C). It was therefore unlikely that the protective effect of MPE-001 was mediated by a transcriptional upregulation of antioxidant enzymes in our model.

MPE-001 improved autophagic flux in NaIO₃-treated hTERT RPE-1 cells and its cytoprotective effect was autophagy-dependent

We next investigated the possibility that autophagy is involved in the protective effect of MPE-001. Microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B) is a structural protein of autophagosomal membranes. Cytosolic LC3-I undergoes lipidation to form LC3-II which gets integrated into growing phagophores, making LC3-II/I ratio a useful tool for the assessment of autophagy (27). Statistically significant increase in LC3-II/I ratio was observed after 4 hours of NaIO₃ treatment. A non-significant increase of similar extent was also observed in the presence of the lysosomal acidification inhibitor bafilomycin A1, raising the possibility that NaIO₃ inhibits autophagic flux. Co-treating the cells with MPE-001 did not further increase or decrease this ratio in the absence of bafilomycin A1 but it further increased LC3-II/I ratio in the presence of bafilomycin A1. In fact, fold change in LC3-II/I ratio in MPE-001 and NaIO₃ co-treated cells compared to respective controls was higher in the presence of bafilomycin A1 (~ 4.25-fold) than in its absence (~ 2.74-fold) (Fig. 4A). Altogether, these data indicate that NaIO₃ alone promoted autophagosomes formation but inhibited autophagic flux, while adding MPE-001 further increased autophagosomal biogenesis and restored autophagic flux. Similarly, immunostaining of the ubiquitin-binding protein p62 showed an increase in the number of p62 puncta following NaIO₃ treatment. In the presence of bafilomycin A1, MPE-001 and NaIO₃ co-treated cells seemed to have a higher number of p62 puncta than when cells were treated with NaIO₃ alone (Fig. 4B).

To confirm the effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatment on autophagic flux, LC3B co-localization with lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) was investigated. Co-

localization of LC3B puncta and LAMP1-RFP was seen in untreated and MPE-001-treated cells, whereas this co-localization was lost in NaIO₃-treated cells. Co-treatment with MPE-001 recovered the co-localization (Fig. 4C). These results suggest that NaIO₃-treated cells has a defect in the fusion of autophagosomes to lysosomes and that MPE-001 corrects it.

Both autophagy inhibitors wortmannin and bafilomycin A1 were observed to abolish the cytoprotective effect of MPE-001 (Fig. 4D), confirming that its effect is indeed dependent on autophagy. In contrast to MPE-001, the antioxidant NAC improved the cellular viability of NaIO₃-treated cells independently from autophagy, as its effect was not abolished by bafilomycin A1 (Sup. Fig 4A-B).

MPE-001 improved autophagosomes maturation in NaIO₃-treated hTERT RPE-1 cells

Mature autophagosomes that are ready to fuse with lysosomes are LC3B- and syntaxin 17- (STX17) positive (28). To better understand how MPE-001 restores autophagic flux in NaIO₃-treated cells, co-localization of LC3B puncta with STX17 was investigated by immunostaining in the presence of bafilomycin A1. Co-localization was scarce in NaIO₃-treated cells despite the increased formation of LC3B puncta, suggesting that these cells have a defect in autophagosomal maturation. Intriguingly, MPE-001 and NaIO₃ co-treatment increased not only the proportion of LC3B puncta that co-localize with STX17, but also STX17 accumulation outside of autophagosomes (Fig 5A). Western blotting confirmed that MPE-001 and NaIO₃ co-treatment increases STX17 expression (Fig 5B).

MPE-001 prevents NaIO₃-induced mitochondrial superoxide production through autophagy enhancement

Mitochondria are both a target and a major source of ROS. Improper removal of damaged mitochondria by autophagy results in their excessive generation of ROS (29) and might be responsible for NaIO₃-induced cell death. We therefore verified the effect of NaIO₃

and/or MPE-001 treatment on mitochondrial ROS formation. NaIO₃ was found to increase mitochondrial superoxide formation in a concentration-dependent manner (Fig. 6A). MPE-001 decreased the formation of mitochondrial superoxide formation induced by 12.5 mM NaIO₃ but not in the presence of wortmannin (Fig. 6B), indicating that the effect of MPE-001 on mitochondrial ROS formation results from its pro-autophagic effect. Immunostaining of translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) and LAMP1-RFP showed that mitochondrial fragments accumulate outside of lysosomes in NaIO₃-treated cells, whereas mitochondrial fragments were found within lysosomes in MPE-001 and NaIO₃ co-treated cells (Fig. 6C). Immunostaining of LC3B and TOMM20 in the presence of bafilomycin A1 showed that NaIO₃ treatment is however able to increase the recruitment of autophagosomes to mitochondria (Fig. 6D). These data further support that NaIO₃-treated cells have a defect in the later steps of autophagy, rather than in the earlier steps of phagophore formation, elongation and cargo engulfment.

To verify if decreasing mitochondrial ROS is sufficient to promote the survival of NaIO₃-treated cells, the effect of two mitochondrial-selective ROS scavengers were tested. 1 hour pretreatment with MitoTEMPO failed to decrease mitochondrial superoxide formation (Sup. Fig. 4C) and cell loss (Sup. Fig. 4D). MitoQ is thought to insert itself in the inner mitochondrial membrane (30) in contrast to MitoTEMPO which goes across the membrane to accumulate in mitochondrial matrix (31). 1 hour pretreatment with MitoQ decreased NaIO₃-induced mitochondrial superoxide formation (Sup. Fig. 4E), but failed to increase cellular viability (Sup. Fig. 4F). The sole scavenging of mitochondrial ROS might be insufficient to rescue RPE cells from NaIO₃-induced cytotoxicity.

MPE-001 does not interfere with POS phagocytosis by hTERT RPE-1

CD36 in the RPE is mainly known for its role in POS phagocytosis (32, 33). Interfering with POS phagocytosis would have deleterious effect on retinal homeostasis, as animal models with a defect in RPE phagocytic activity have been shown to present retinal degeneration (34-36). The kinetic and the extent of POS-FITC internalization by hTERT RPE-

1 cells after 4 hours were unaffected by the presence of MPE-001 (Fig. 7A). Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, was used as control (Fig. 7B). Since continuous exposure to cytochalasin D was cytotoxic (data not shown), cells were pretreated with cytochalasin D for 30 minutes, washed and then challenged with POS-FITC. Cytochalasin D-treated cells showed a lower internalization of POS-FITC after 2 and 4 hours of challenge.

Discussion

Combined supplementation of antioxidants (vitamin C and E, lutein, zeaxanthin) and zinc and copper is currently recommended to AMD patients in an attempt to limit oxidative damages to the RPE and preserve photoreceptor integrity (37). However, the effect of such supplementation on disease progression is limited to those who are already in the advanced stage of the disease (38, 39) and it has not been shown to prevent disease onset (40). A different approach to prevent or halt the disease at an earlier stage is urgently needed. CD36 appears as a promising therapeutic target as it is likely involved in sterile inflammation and lipid deposition observed in dry AMD. Our previous work on the effect of the GHRP-6 derivative EP80317 as a CD36 ligand demonstrated its beneficial effect in preserving photoreceptor function in a mouse model of AMD (18). Whether CD36 ligands derivative of GHRP-6 have any effect on oxidative stress and RPE preservation had yet to be investigated.

In this study, the cytoprotective effect of the novel GHRP-6 derivative MPE-001 against oxidative stress was investigated in human RPE cells in culture. We found that MPE-001 as a CD36 ligand increases the viability of hTERT RPE-1 cells in which oxidative stress was induced by NaIO_3 . MPE-001 decreased cellular ROS and prevented apoptotic cell death. Its protective effect was not mediated by a transcriptional upregulation of antioxidant enzymes expression but was rather dependent on an increase in autophagy. More precisely, MPE-001 increased LC3-II/I ratio and p62 puncta in NaIO_3 -treated cells in the presence of bafilomycin A1 and restored the co-localization of LC3B puncta with lysosomes which was disrupted by NaIO_3 . In fact, MPE-001 and NaIO_3 co-treated cells showed a higher amount of mature STX17-positive autophagosomes in the presence of bafilomycin A1. In addition, we showed that improved

autophagy results in decreased mitochondrial superoxide production. Of primary importance, MPE-001 did not interfere with the phagocytic activity of hTERT RPE-1 cells.

Ever since the observation by Sorsby in 1941 that intravenously injected NaIO₃ induces a retinal degeneration through selective damages to the RPE (41), this oxidant has long been used in animals (42-45) and in RPE cell culture system (45-50) to model oxidative stress involved in AMD development. Cell death modes undergone by RPE cells in culture following treatments with NaIO₃ have been extensively studied by others. Acute NaIO₃ treatment (24 hours) was reported to induce apoptosis mediated by caspase 3/7/8 activation (46, 50) and necroptosis (45, 50, 51) of ARPE-19 cells. In accordance with those studies, NaIO₃ was confirmed to induce caspase 3/7 activation and LDH release in hTERT RPE-1 cells. The cytotoxic effect of NaIO₃ was concentration-dependent, which also concords with those previous studies. NaIO₃-induced cell death in hTERT RPE-1 cells was accompanied by a disruption of the mitochondrial membrane potential as reported by others in ARPE-19 cells using JC-1 ratiometric analysis and/or imaging (46, 49). MPE-001 was found to decrease NaIO₃-induced ROS formation and specifically block RPE cells mitochondrial depolarization and caspase 3/7-mediated apoptosis but not LDH release. The protective effect of MPE-001 was equally observed in a primary culture of murine RPE cells.

Many have proposed to boost RPE cells' antioxidant system as a potential strategy to treat AMD (49, 52, 53). The activation of Nrf2, in particular, has been shown to protect RPE cells from oxidative stress both *in vitro* (49) and *in vivo* (44). MPE-001 was not observed to upregulate antioxidant enzymes expression in our model at the studied time points. In fact, the effect of MPE-001 on ROS formation was observed as early as 2 hours following NaIO₃ treatment, making it unlikely that *de novo* transcription of antioxidant enzymes is responsible for its effect.

Recent studies have focused their interest on the impact of oxidative stress on autophagy in the RPE. Autophagy markers were observed to be increased in ARPE-19 cells upon NaIO₃ treatment (47-50) and autophagy enhancement was found to protect RPE cells from NaIO₃- (49) and H₂O₂- (54) induced oxidative stress. Mitter *et al.* showed that blockade of autophagy by 3-methyladenine or knockdown of *ATG7* or *Beclin-1* exacerbates the oxidative and cytotoxic effects of H₂O₂ (54). These studies suggest that autophagy plays a crucial role in RPE cell defense against oxidative damages. We showed that although NaIO₃ treatment increases

autophagosomal biogenesis, it inhibits the later steps of autophagy, resulting in the accumulation of autophagosomes that are unfused to lysosomes. Co-treatment with MPE-001 promoted autophagosomes formation and restored autophagic flux. Furthermore, the cytoprotective effect of MPE-001 was solely mediated by this increase in autophagy, as its effect was completely abolished by wortmannin and bafilomycin A1. A role of CD36 in promoting autophagy has recently been reported in the context of its activation by the secreted glycoprotein CD5 antigen-like protein (CD5L) in macrophages (55). Although its involvement in AMD pathogenesis has yet to be elucidated, CD5L is expressed in RPE cells and is found in high circulating amount in some AMD patients (56).

STX17 is a soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) required for autophagosome-lysosome fusion. Itakura *et al.* reported that STX17 is recruited to the outer membrane of autophagosomes only after their completion and not at intermediate unclosed state. Additionally, depletion of *STX17* was shown to cause an accumulation of autophagosomes without degradation (57). We found that NaIO₃ treatment increases the formation of autophagosomes but that only few of them are STX17-positive, indicating that defect in autophagosomal closure or maturation is responsible for the loss of autophagosome-lysosome fusion in NaIO₃-treated cells. MPE-001 increased the proportion of LC3B puncta that co-localize with STX17 in NaIO₃-treated cells. Interestingly, MPE-001 and NaIO₃-cotreatment was also observed to increase STX17 expression. To our knowledge, increase in STX17 expression by a pharmacological agent has never been described before and would merit further investigation.

The cytotoxic effect of NaIO₃ has previously been associated with increased mitochondrial superoxide formation (46) as it was the case in our study. Mitophagy, the autophagic removal of mitochondria, is an important adaptive mechanism during oxidative stress to prevent further damage and cell death (29). We found that MPE-001 decreases NaIO₃-induced mitochondrial superoxide production in an autophagy-dependent manner, which likely contributes to its cytoprotective effect. Scavenging of mitochondrial ROS by MitoQ, however, was not observed to rescue hTERT RPE-1 cells. The cytoprotective effect of MPE-001 might be attributable not only to a better clearance of defective mitochondria, but also to a better elimination of cytosolic damaged proteins that are otherwise cytotoxic. Another possibility is that even if MitoQ diminishes mitochondrial superoxide to the same extent as MPE-001 after a

2-hour treatment with NaIO₃, damaged mitochondria still accumulate over time due to impaired autophagic flux.

Conclusion

In summary, we report for the first time that a ligand of the scavenger receptor CD36 can enhance autophagy in RPE cells, thus protecting them from oxidative damages. This study is the first report that establishes a direct link between CD36 activation and cellular redox status in RPE cells. Together with its known anti-inflammatory effect, we suggest modulation of oxidative stress by GHRP-6 derivative ligands of CD36 as a potential novel strategy to preserve RPE and photoreceptor integrity in dry AMD.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (Grant number PPP-90157). M-FD received financial supports from CIHR, Fonds de recherche Santé – Québec (FRQS), the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and Mitacs Globalink.

Conflict of interest

All authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' contributions

M-FD designed the study, carried out all experiments and wrote the manuscript. MM, SK and KI gave crucial advices in designing the study and on experimental procedures and revised the manuscript. WDL was responsible for MPE-001 synthesis. HO supervised M-FD and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *The British journal of ophthalmology*. 2012;96(5):614-8.
2. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2017;60:201-18.
3. Hernandez-Zimbron LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De la Paz L, Velez-Montoya R, Zenteno E, Gullias-Canizo R, et al. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:14.
4. Karunadharma PP, Nordgaard CL, Olsen TW, Ferrington DA. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(11):5470-9.
5. Decanini A, Nordgaard CL, Feng X, Ferrington DA, Olsen TW. Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(4):607-15.
6. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, et al. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology*. 2006;90(1):75-80.
7. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11282-7.
8. Zhao Z, Chen Y, Wang J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, et al. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PloS one*. 2011;6(4):e19456-e.
9. Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, Zhan X, Crabb JW, Kim SR, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(10):4407-20.
10. Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8495160.
11. Golestaneh N, Chu Y, Xiao Y-Y, Stoleru GL, Theos AC. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell death & disease*. 2017;8(1):e2537-e.
12. Zhang Y, Cross SD, Stanton JB, Marmorstein AD, Le YZ, Marmorstein LY. Early AMD-like defects in the RPE and retinal degeneration in aged mice with RPE-specific deletion of Atg5 or Atg7. *Molecular vision*. 2017;23:228-41.
13. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science signaling*. 2009;2(72):re3-re.
14. Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11830-5.

15. Yamada Y, Tian J, Yang Y, Cutler RG, Wu T, Telljohann RS, et al. Oxidized low density lipoproteins induce a pathologic response by retinal pigmented epithelial cells. *Journal of neurochemistry*. 2008;105(4):1187-97.
16. Howes KA, Liu Y, Dunaief JL, Milam A, Frederick JM, Marks A, et al. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(10):3713-20.
17. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2002;120(11):1435-42.
18. Picard E, Houssier M, Bujold K, Sapieha P, Lubell W, Dorfman A, et al. CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging*. 2010;2(12):981-9.
19. Turcotte S, Mellal K, Chingle R, Mulumba M, Omri S, Dif-Yaiche L, et al. Azasulfurylpeptide Modulation of CD36-Mediated Inflammation Without Effect on Neovascularization. *Biomedicines*. 2018;6(4):98.
20. Houssier M, Raoul W, Lavalette S, Keller N, Guillonneau X, Baragatti B, et al. CD36 Deficiency Leads to Choroidal Involution via COX2 Down-Regulation in Rodents. *PLoS medicine*. 2008;5(2):e39.
21. Mao Y, Finnemann SC. Analysis of photoreceptor outer segment phagocytosis by RPE cells in culture. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;935:285-95.
22. Rambhatla L, Chiu CP, Glickman RD, Rowe-Rendleman C. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(5):1622-30.
23. Gong X, Harrell M, Mitchell D, Sundin O, Rubin L. A new human retinal pigment epithelial cell model for interrogating the protective functions of xanthophylls in retinopathies (39.2). *The FASEB Journal*. 2014;28(1_supplement):39.2.
24. Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, Ahmad A, Takeuchi K, Morioka E, et al. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca(2+) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Scientific reports*. 2017;7:44175-.
25. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet*. 2009;43:95-118.
26. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in Enzyme Regulation*. 2006;46(1):113-40.
27. Wang AL, Boulton ME, Dunn WA, Jr., Rao HV, Cai J, Lukas TJ, et al. Using LC3 to monitor autophagy flux in the retinal pigment epithelium. *Autophagy*. 2009;5(8):1190-3.
28. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9):1865.
29. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal*. 2012;441(2):523-40.
30. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4588-96.
31. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(7):1289-301.

32. Finnemann SC, Silverstein RL. Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J Exp Med*. 2001;194(9):1289-98.
33. Sun M, Finnemann SC, Febbraio M, Shan L, Annangudi SP, Podrez EA, et al. Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(7):4222-30.
34. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Human molecular genetics*. 2000;9(4):645-51.
35. Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, et al. Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *The American journal of pathology*. 2002;161(4):1515-24.
36. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J Exp Med*. 2004;200(12):1539-45.
37. Age-Related Eye Disease Study 2 Research G. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Jama*. 2013;309(19):2005-15.
38. Age-Related Eye Disease Study Research G. A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. *JAMA Ophthalmology*. 2001;119(10):1417-36.
39. Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report number 3. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2224-32.
40. Evans J. Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis. *Eye*. 2008;22:751.
41. Sorsby A. EXPERIMENTAL PIGMENTARY DEGENERATION OF THE RETINA BY SODIUM IODATE. *The British journal of ophthalmology*. 1941;25(2):58-62.
42. Liu C-N, Peng Q, W Yates D, Huang W, Devantier H, Aguirre S. Ocular Safety Assessment of Sodium Iodate in Cynomolgus Monkeys: Characterization of a Classic Retinal Toxicant 2016.
43. Moriguchi M, Nakamura S, Inoue Y, Nishinaka A, Nakamura M, Shimazawa M, et al. Irreversible Photoreceptors and RPE Cells Damage by Intravenous Sodium Iodate in Mice Is Related to Macrophage Accumulation Irreversible Damage by NaIO₃ and Macrophage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2018;59(8):3476-87.
44. Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res*. 2014;119:111-4.
45. Hanus J, Anderson C, Sarraf D, Ma J, Wang S. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discov*. 2016;2:16054.
46. Mao X, Pan T, Shen H, Xi H, Yuan S, Liu Q. The rescue effect of mesenchymal stem cell on sodium iodate-induced retinal pigment epithelial cell death through deactivation of NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;103:517-23.

47. Lin Y-C, Horng L-Y, Sung H-C, Wu R-T. Sodium Iodate Disrupted the Mitochondrial-Lysosomal Axis in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;34(7):500-11.
48. Zhang X-Y, Ng TK, Brelén ME, Wu D, Wang JX, Chan KP, et al. Continuous exposure to non-lethal doses of sodium iodate induces retinal pigment epithelial cell dysfunction. *Scientific Reports*. 2016;6:37279.
49. Saito Y, Kuse Y, Inoue Y, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. Transient acceleration of autophagic degradation by pharmacological Nrf2 activation is important for retinal pigment epithelium cell survival. *Redox Biol*. 2018;19:354-63.
50. Chan C-M, Huang D-Y, Sekar P, Hsu S-H, Lin W-W. Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):40-.
51. Lin H, Roh M, Matsumoto H, Atik A, Bouzika P, Alhatem A, et al. Blocking the Necroptosis Pathway Decreases RPE and Photoreceptor Damage Induced by NaIO₃. *bioRxiv*. 2018:387068.
52. Sternberg P, Jr., Davidson PC, Jones DP, Hagen TM, Reed RL, Drews-Botsch C. Protection of retinal pigment epithelium from oxidative injury by glutathione and precursors. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1993;34(13):3661-8.
53. Satish S, Philipose H, Rosales MAB, Saint-Geniez M. Pharmaceutical Induction of PGC-1 α Promotes Retinal Pigment Epithelial Cell Metabolism and Protects against Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:9248640-.
54. Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy*. 2014;10(11):1989-2005.
55. Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, Naranjo-Gómez M, Arias L, Armengol C, et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy*. 2015;11(3):487-502.
56. Iannaccone A, Hollingsworth TJ, Koirala D, New DD, Lenchik NI, Beranova-Giorgianni S, et al. Retinal pigment epithelium and microglia express the CD5 antigen-like protein, a novel autoantigen in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2017;155:64-74.
57. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012;151(6):1256-69.
58. Button RW, Roberts SL, Willis TL, Hanemann CO, Luo S. Accumulation of autophagosomes confers cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(33):13599-614.

Table

Table 1. Primers sequences

Gene symbol	Gene name	Forward	Reverse
<i>CAT</i>	Catalase	gctcattttgaccgagagaga	tgacctcaaagtagccaaagg
<i>CD36</i>	Cluster of differentiation 36	tggaacagaggctgacaactt	ttgattttgatagatatgggatgc
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gagccaaaagggtcatcatctc	aggaggcattgctgatgatct
<i>GCLM</i>	Glutamate-cysteine ligase modifier subunit	gacaaaacacagttggaacagc	cagtcaaatctggtggcatc
<i>GPX1</i>	Glutathione peroxidase 1	cgccaagaacgaagagattc	gttcacctcgcaacttctcg
<i>HMOX1</i>	Heme oxygenase 1	ggcagagggtgatagaagagg	agctcctgcaactcctcaaa
<i>NFE2L2</i>	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	acacggtccacagctcatc	tgctccaaagtatgtcaatca
<i>NQO1</i>	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1	cagctcaccgagagcctagt	gagtgagccagtacgatcagtg
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	cctaaagcatacgggtcctg	tttcaacttggccaaacacca
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin 1	aggcctccagttcactgac	tttgctcttttgacatcagg
<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	agcaaaattattcagcaccagtt	ccttaaaatagggtgcatgctg
<i>PRDX5</i>	Peroxiredoxin 5	tcctggctgatcccactg	atgccatcctgtaccacat
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	tccatgttcagagtttgagat	cccaccgtgttttctggata
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2	aatcaggatccactgcaagg	taagcgtgctcccacacat
<i>TXN2</i>	Thioredoxin 2	gagacaccagtggttggtga	ttggccaccatcttctctaac
<i>TXNRD1</i>	Thioredoxin reductase 1	caattggaatccaccctgtc	ccacactggggcttaacct
<i>YWHAZ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	gcaattactgagagacaactgaca	tggaaggccggttaatttt

Figures

Figure 1

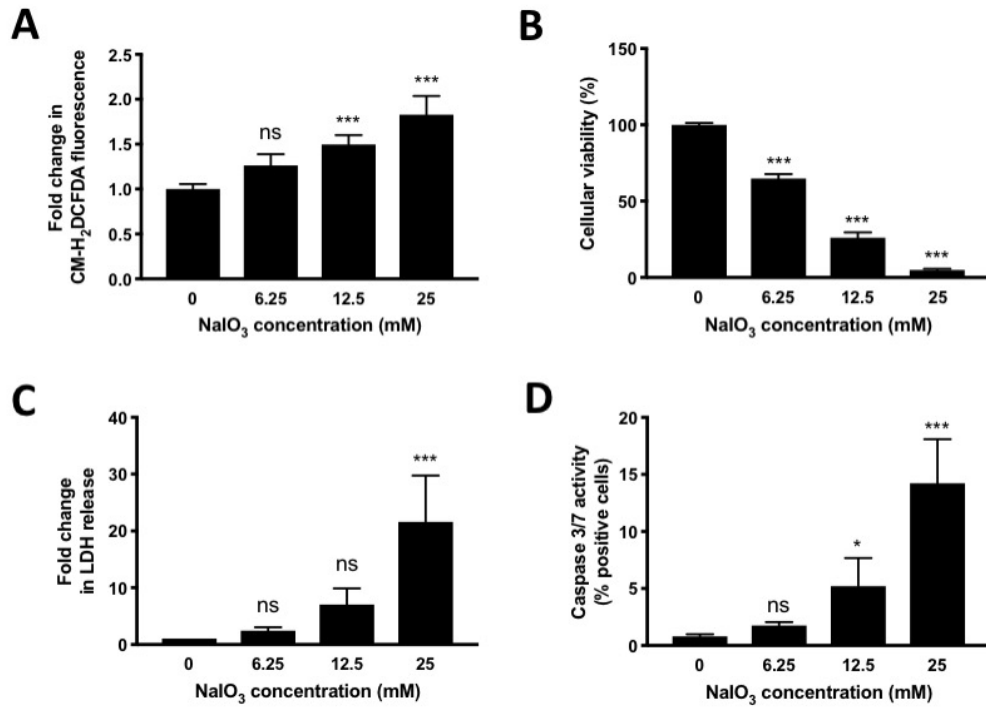


Figure 2

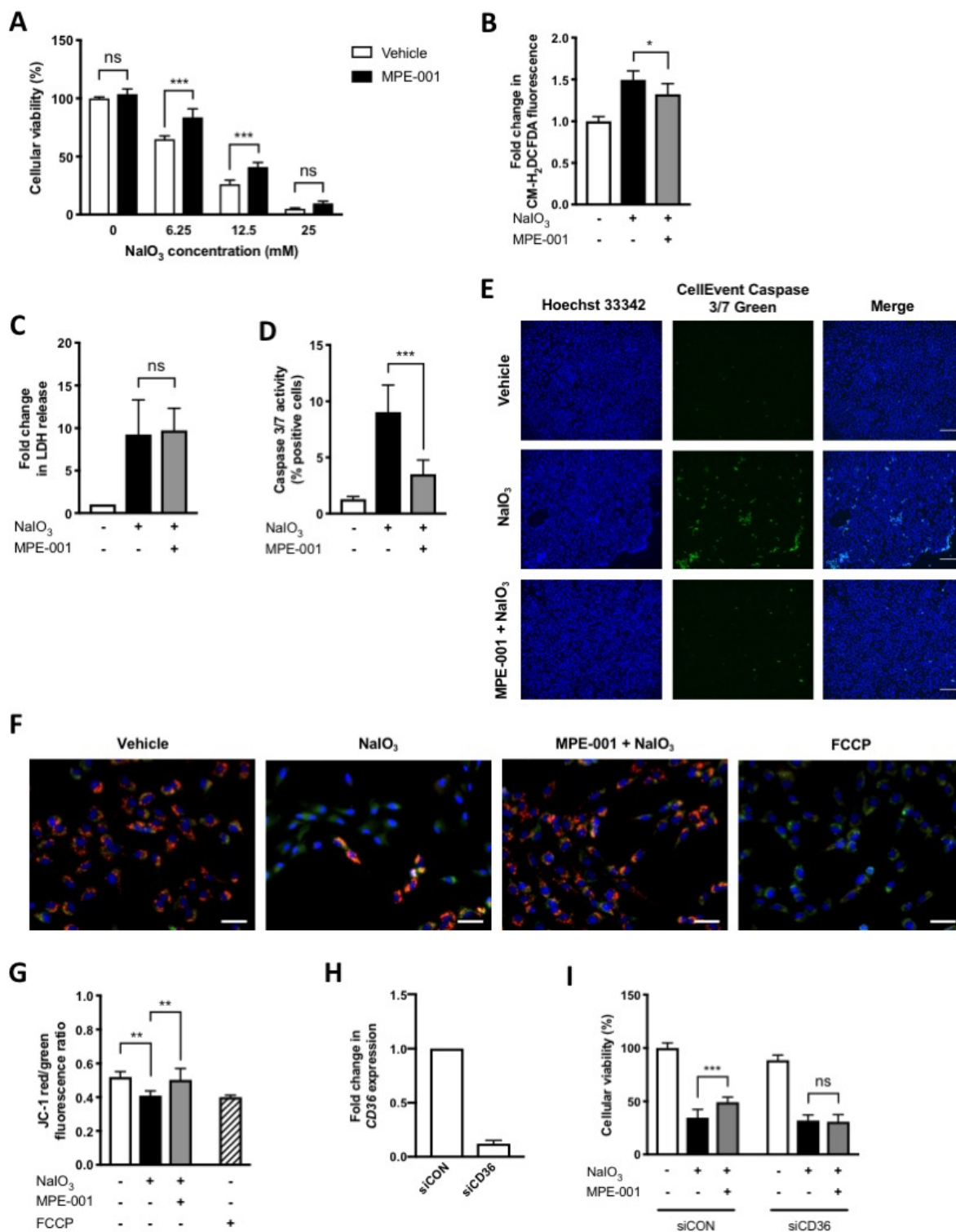


Figure 3

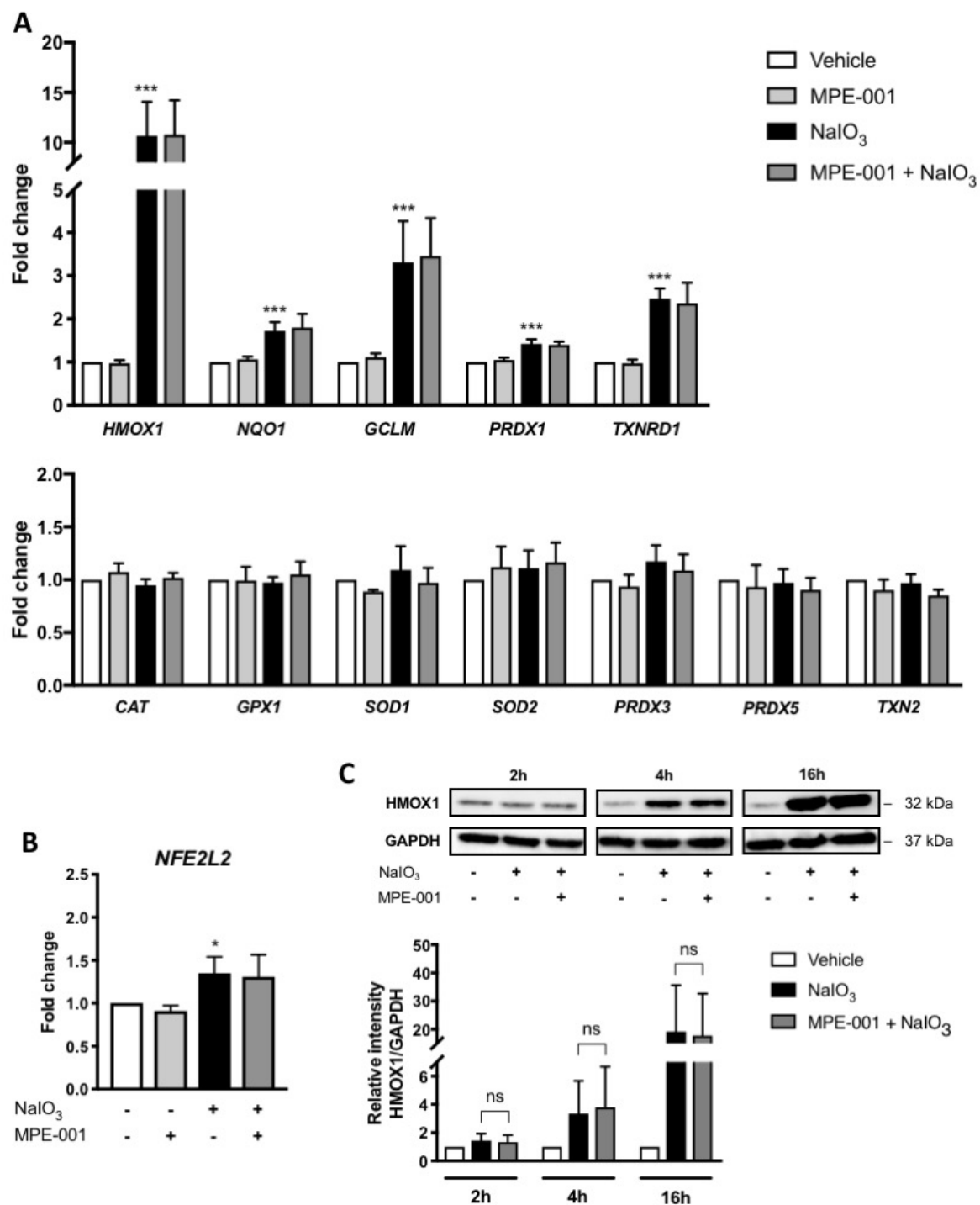


Figure 4

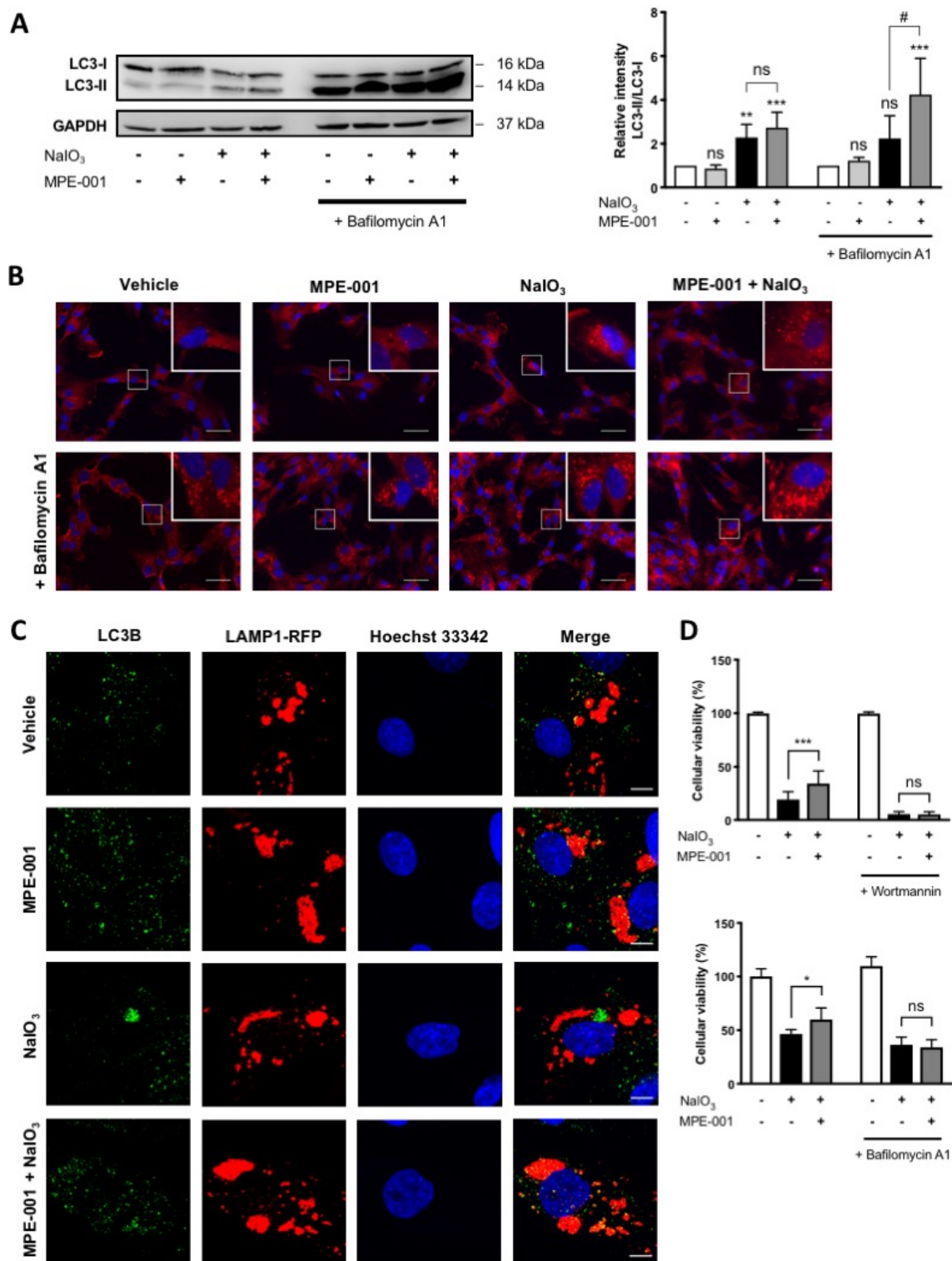


Figure 5

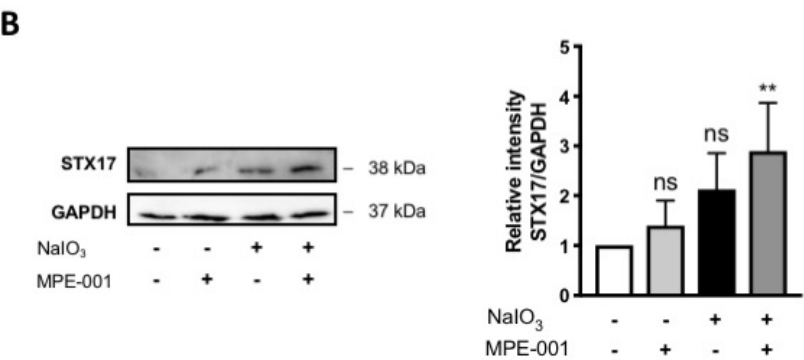
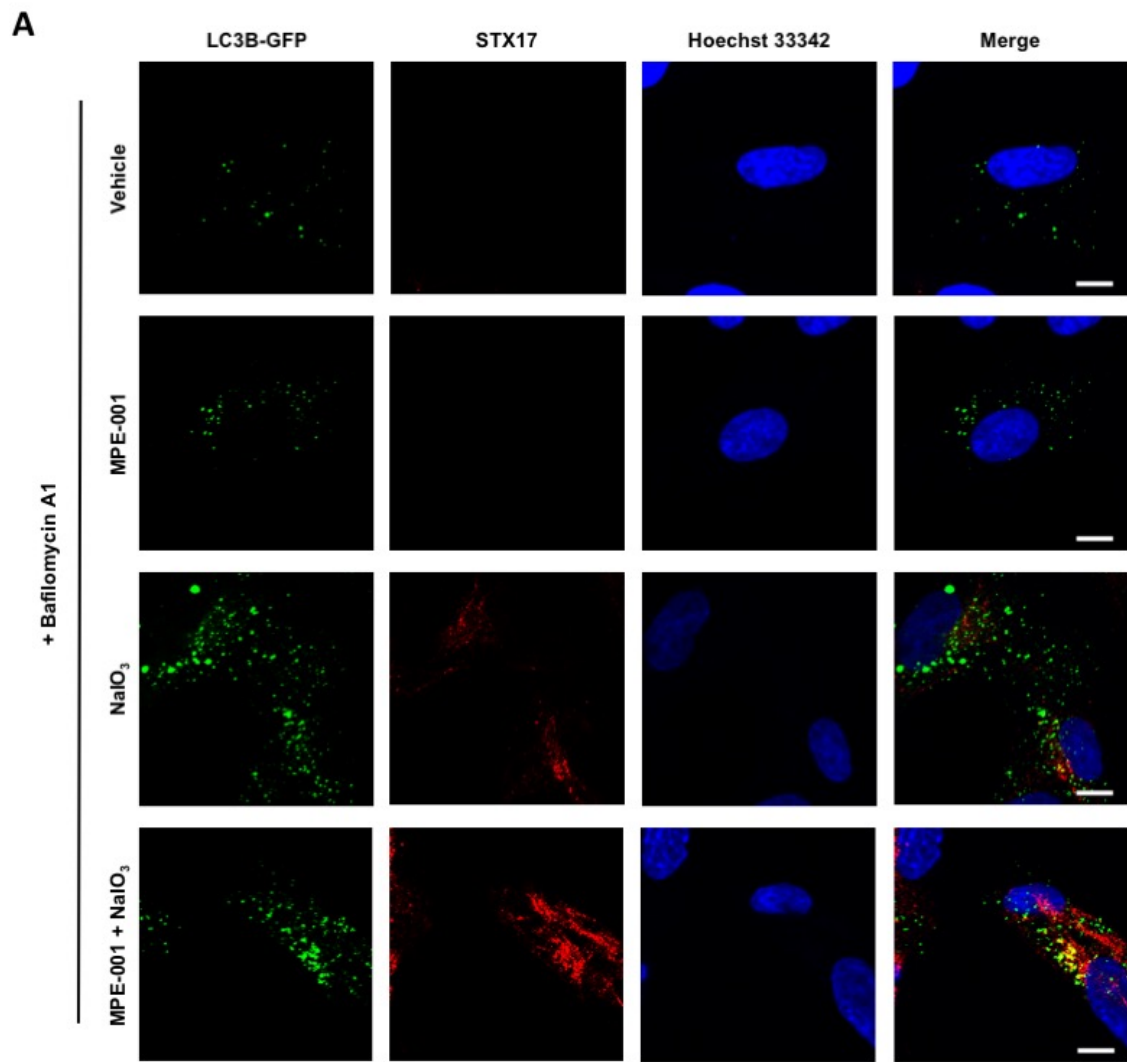


Figure 6

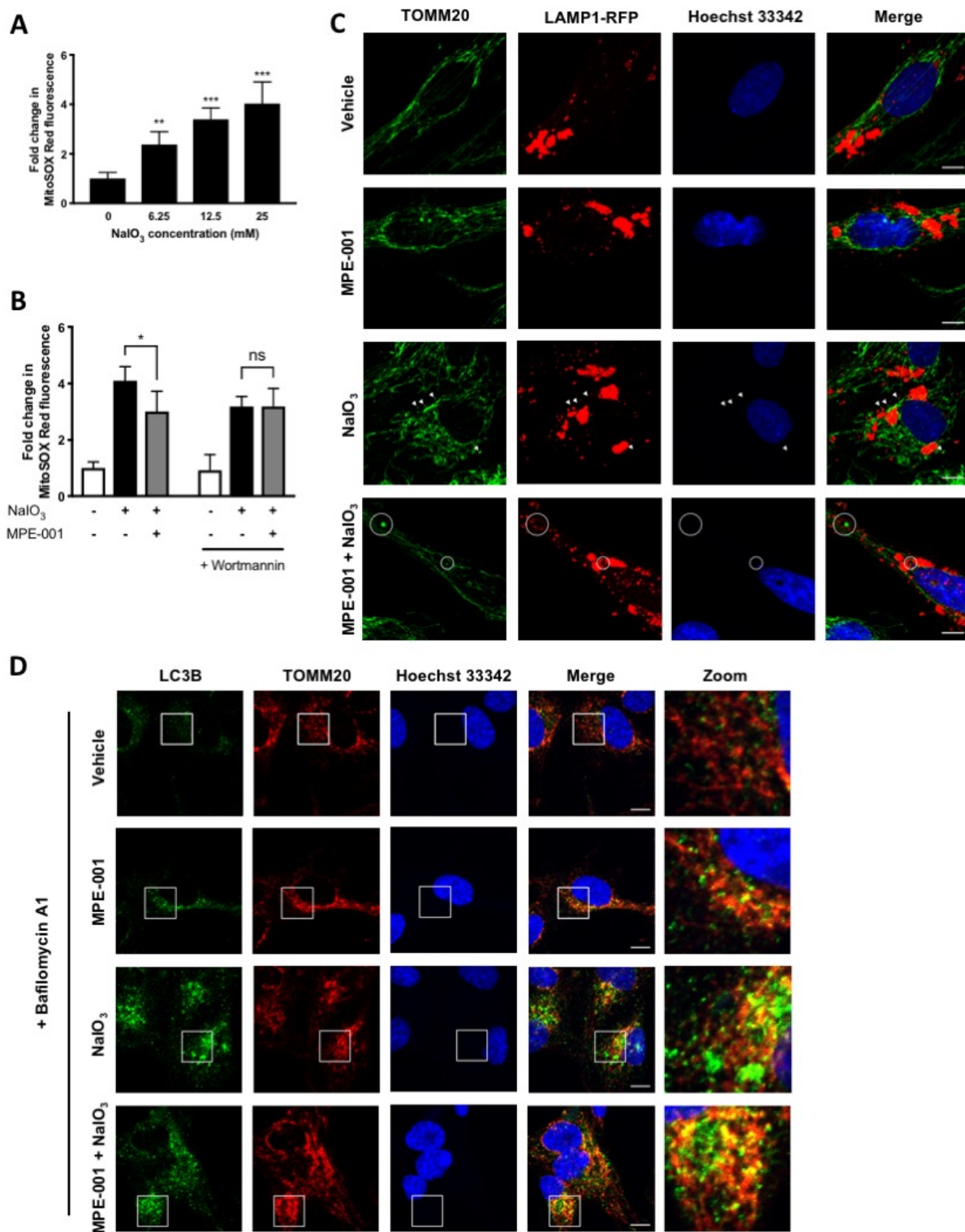
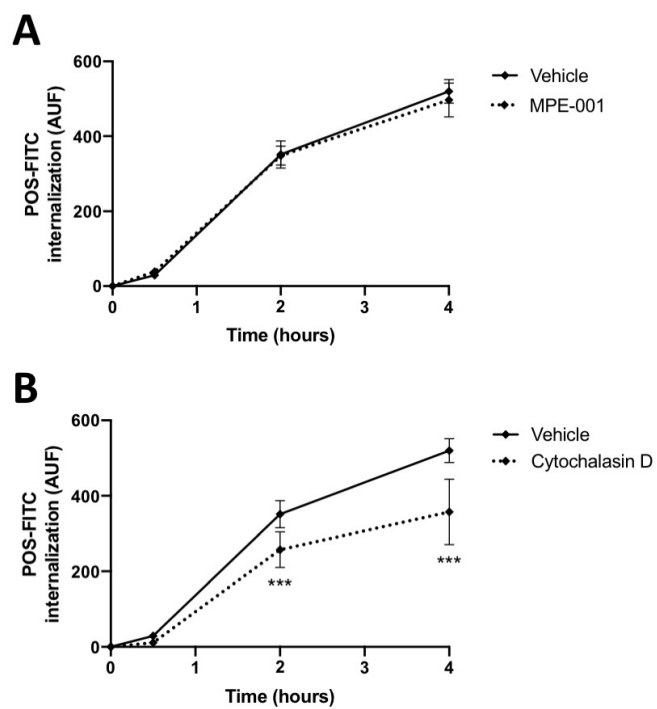
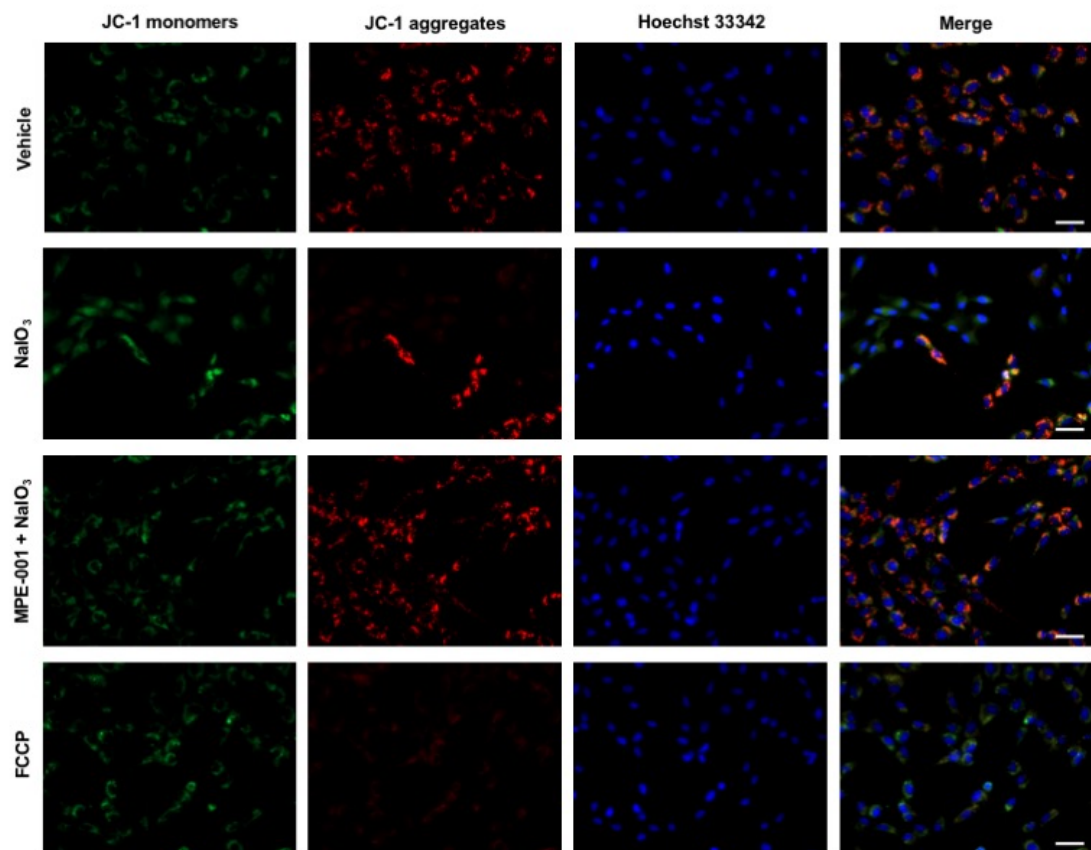


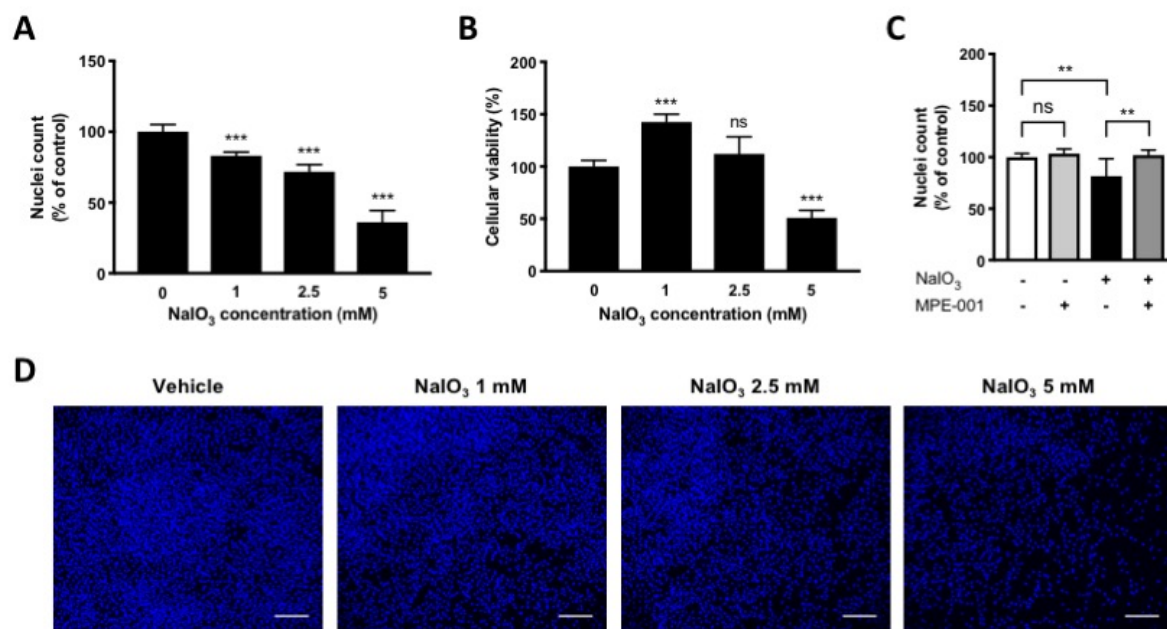
Figure 7



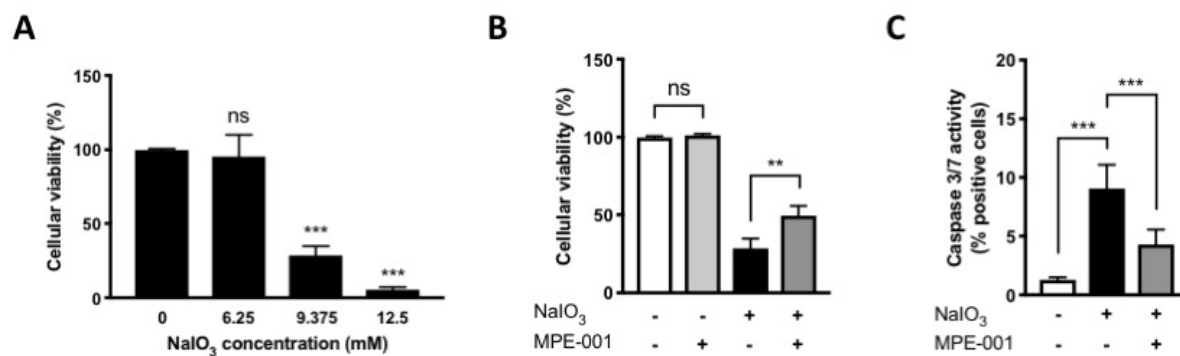
Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4

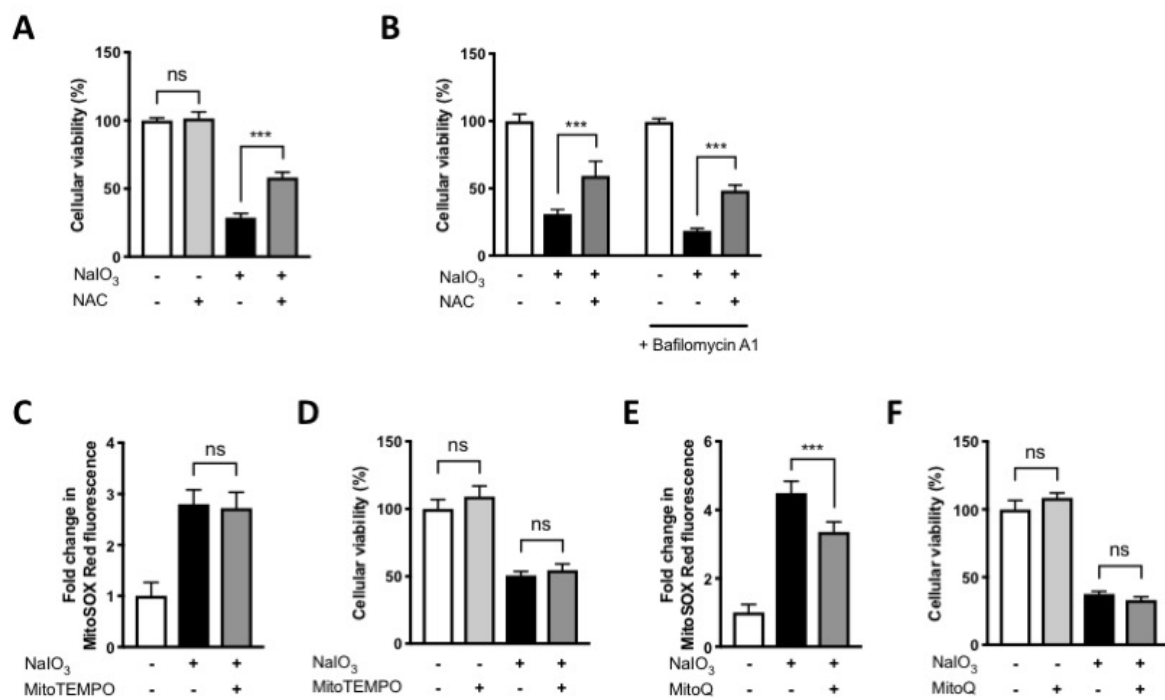


Figure legends

Figure 1. The cytotoxic effect of NaIO₃ on hTERT RPE-1 cells. hTERT RPE-1 cells were treated with increasing concentrations of NaIO₃. (A) Cellular ROS after 2 hours relative to untreated cells. Representative data of three independent experiments. (B) Cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours. Representative data of three independent experiments. (C) Percentage of LDH release after 24 hours relative to untreated cells (n=4). (D) Percentage of cells positive for active caspase 3/7 after 4 hours. Representative data of three independent experiments. Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs control.

Figure 2. The cytoprotective effect of MPE-001 on hTERT RPE-1 cells against NaIO₃. hTERT RPE-1 cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃. (A) Cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours of NaIO₃ treatment. Representative data of three independent experiments. (B) Cellular ROS after 2 hours of NaIO₃ treatment relative to untreated cells. Representative data of three independent experiments. (C) Percentage of LDH release after 24 hours of NaIO₃ treatment relative to untreated cells (n=4). (D) Percentage of cells positive for active caspase 3/7 after 4 hours of NaIO₃ treatment. Representative data of three independent experiments. (E) Representative images of CellEvent Caspase 3/7 Green and Hoechst 33342 staining (scale bar = 200 μ m). Representative images of JC-1 staining (F; JC-1 aggregate: red, JC-1 monomer: green, Hoechst 33342: blue; scale bar = 50 μ m) and red to green fluorescence ratio of JC-1 (G) after 4 hours of NaIO₃ treatment. 5 μ M FCCP was used as control. Representative data of three independent experiments. *CD36* mRNA expression (H; n=3) and cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours of NaIO₃ treatment (I; representative data of three independent experiments) of cells incubated for 72 hours with either 20 nM control siRNA (siCON) or *CD36* siRNA (siCD36). Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatments on antioxidant enzyme expression. hTERT RPE-1 cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃. mRNA level of antioxidant enzymes (A) and *NFE2L2* expression (B) after 4 hours of NaIO₃ treatment relative to untreated cells. n = 4, mean \pm SD, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs control. (C) Immunoblot of HMOX1 and GAPDH (upper) and relative quantification of HMOX1 (lower; n = 4) at different time points following NaIO₃ treatment. Mean \pm SD, ns = non-significant.

Figure 4. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatments on autophagy. hTERT RPE-1 cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃ for 4 hours. (A) Immunoblot of LC3B and GAPDH (left) and relative quantification of LC3-II/LC3-I ratio (right; n=5) in the presence/absence of 10 nM bafilomycin A1. Mean \pm SD, ns = non-significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control, # $p < 0.05$ vs NaIO₃. (B) Representative images of p62 immunostaining in the presence/absence of 10 nM bafilomycin A1 (p62: red, Hoechst 33342: blue; scale bar = 50 μ m). (C) Representative images of LC3B immunostaining and LAMP1-RFP (scale bar = 10 μ m). The same gamma correction was applied to all images. (D) Cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours of NaIO₃ treatment in the presence/absence of 100 nM wortmannin (upper) or 10 nM bafilomycin A1

(lower). Representative data of three independent experiments. Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 5. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatments on the maturation of autophagosomes. hTERT RPE-1 cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃ for 4 hours. (A) Representative images of LC3B-GFP and STX17 immunostaining in the presence of 10 nM bafilomycin A1 (scale bar = 10 μ m). The same gamma correction was applied to all images. (B) Immunoblot of STX17 and GAPDH (left) and relative quantification of STX17 (right; n=4). Mean \pm SD, ns = non-significant, ** $p < 0.01$ vs control.

Figure 6. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatments on mitochondrial ROS and mitophagy. (A) Mitochondrial superoxide formation in hTERT RPE-1 cells treated with increasing concentrations of NaIO₃ for 2 hours relative to control. Representative data of three independent experiments. (B-D) Cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃ (B) Mitochondrial superoxide formation in the presence/absence of 100 nM wortmannin after 2 hours of NaIO₃ treatment. Representative data of three independent experiments. (C) Representative images of TOMM20 immunostaining and LAMP1-RFP after 4 hours of NaIO₃ treatment (arrow heads show mitochondrial fragments outside of lysosomes; mitochondrial fragments inside lysosomes are circled; scale bar = 10 μ m). The same gamma correction was applied to all images. (D) Representative images of LC3B and TOMM20 immunostaining in the presence of 10 nM bafilomycin A1 after 4 hours of NaIO₃ treatment (scale bar = 10 μ m). The same gamma correction was applied to all images. Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 7. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatments on the phagocytic activity of hTERT RPE-1 cells. (A) hTERT RPE-1 cells were preloaded with 1 μ M MPE-001 for 30 minutes and challenged with POS-FITC. (B) Cells were treated with 1 μ M cytochalasin D for 30 minutes, washed and challenged with POS-FITC. (A) and (B) were carried out in parallel. Representative data of three independent experiments. Mean \pm SD, *** $p < 0.001$ vs vehicle.

Supplementary Figure 1. The effect of NaIO₃ and/or MPE-001 treatment on mitochondrial membrane potential. hTERT RPE-1 cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 12.5 mM NaIO₃ for 4 hours, or were treated with 5 μ M FCCP for 4 hours. Representative images of JC-1 staining are shown (scale bar = 50 μ m).

Supplementary Figure 2. The cytoprotective effect of MPE-001 against chronic low concentration NaIO₃ treatment. hTERT RPE-1 cells were treated daily for 72 hours with low concentrations of NaIO₃. Nuclei count using Hoechst 33342 relative to untreated cells (A) vs cellular viability assessed by CCK-8 (B). Mean \pm SD, ns = non-significant, *** $p < 0.001$ vs control. (C) Effect of 1 mM NaIO₃ and/or 1 μ M MPE-001 treatments on nuclei count. Mean \pm SD, ns = non-significant, ** $p < 0.01$. (C) Representative images of Hoechst 33342 staining following NaIO₃ treatments (scale bar = 200 μ m). All data are representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 3. The cytoprotective effect of MPE-001 on murine RPE cells against NaIO₃. (A) Cellular viability of murine RPE cells assessed by CCK-8 upon treatment with increasing concentrations of NaIO₃ for 24 hours. (B and C) Cells were pretreated with 1 μ M MPE-001 for 2 hours and then co-treated with MPE-001 and 9.375 mM NaIO₃. (B) Cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours of NaIO₃ treatment. (C) Percentage of cells positive for active caspase 3/7 after 4 hours of NaIO₃ treatment. All data are representative of three independent experiments. Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 4. The effect of various antioxidant compounds on NaIO₃-induced cytotoxicity. hTERT RPE-1 cells were co-treated with 1.25 mM NAC and NaIO₃ for 24 hours. Cellular viability assessed by CCK-8 in the absence (A) and in the absence/presence of bafilomycin A1 (B). Cells were pretreated with 20 μ M MitoTEMPO for 1 hour before 12.5 mM NaIO₃ treatment was started. Mitochondrial superoxide formation after 2 hours relative to untreated cells (C) and cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours (D) of NaIO₃ treatment. Cells were pretreated with 5 nM MitoQ for 1 hour before 12.5 mM NaIO₃ treatment was started. Mitochondrial superoxide formation after 2 hours relative to untreated cells (E) and cellular viability assessed by CCK-8 after 24 hours (F) of NaIO₃ treatment. All data are representative of three independent experiments. Mean \pm SD, ns = non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

L'étiologie de la forme sèche de la DMLA est actuellement peu comprise. Plusieurs processus associés au vieillissement en combinaison avec les facteurs intrinsèques de l'individu et des facteurs environnementaux semblent résulter à la manifestation de la maladie. Le ciblage simultané de plusieurs processus qui ont lieu dans la pathologie serait peut-être une stratégie efficace pour prévenir ou pour arrêter la progression de la maladie. Le CD36 est une cible thérapeutique intéressante, car il est possiblement impliqué à la fois dans l'accumulation de dépôts lipidiques et dans l'inflammation dans la DMLA. De plus, nous avons précédemment démontré que les ligands du CD36 dérivés du GHRP-6 ont un effet thérapeutique dans des modèles murins de la DMLA (190, 269). Le RPE est l'acteur-clé de la DMLA de forme sèche. Il est impliqué dans le stress oxydatif, l'accumulation de lipofuscine, l'accumulation du fer, l'inflammation et la production de VEGF, tel que nous l'avons vu dans la section 1. Or, nous n'avons jamais examiné les effets bénéfiques potentiels des ligands du CD36 sur la fonction ou la survie des cellules du RPE. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le ligand du CD36 MPE-001 a un effet cytoprotecteur chez les cellules du RPE soumises à un stress oxydatif.

Dans la section 3, nous avons vérifié l'effet cytoprotecteur du MPE-001 contre le stress oxydatif induit par le NaIO_3 chez les cellules du RPE en culture. Nous avons démontré que le MPE-001 augmente la viabilité des cellules hTERT RPE-1 traitées au NaIO_3 . Le MPE-001 était capable de diminuer la production de ROS, en particulier les superoxydes mitochondriaux, et ainsi de prévenir la mort cellulaire apoptotique. L'effet protecteur du MPE-001 n'était pas médié par une augmentation transcriptionnelle de l'expression des enzymes antioxydants, mais était plutôt dépendant de l'autophagie. Plus précisément, il a été observé que le NaIO_3 inhibe la maturation des autophagosomes et en conséquence le flux autophagique. Les cellules co-traitées au MPE-001 et au NaIO_3 semblaient avoir un plus grand nombre d'autophagosomes matures STX17+ en présence de bafilomycine A1 et ont démontré un rétablissement du flux autophagique. D'importance majeure, nous avons observé que le MPE-001 n'interfère pas avec l'activité phagocytaire des cellules hTERT RPE-1. Dans les paragraphes qui suivent, nous soulèverons certains points additionnels sur lesquels nous n'avons pas discuté dans la section 3.

Notre étude a été effectuée chez la lignée hTERT RPE-1. La majorité des études qui portent sur la cytotoxicité induite par le NaIO_3 emploie la lignée ARPE-19. Comme mentionné dans la section 1.1.6., ces deux lignées humaines de cellules du RPE ont la capacité de se différencier, lors de laquelle elles peuvent acquérir plusieurs caractéristiques des cellules du RPE tel qu'on retrouverait *in vivo*. Une étude comparative a révélé que chacune de ces deux lignées a des similarités et des différences en termes de profil d'expression de protéines par rapport aux cellules du RPE humaines primaires (274). Il n'existe aucune étude qui a comparé leur réponse au stress oxydatif induit par le NaIO_3 , mais un groupe de chercheurs a comparé leur susceptibilité à divers oxystérols et au LDLox. Selon leur étude, les cellules hTERT RPE-1 étaient plus résistantes aux oxystérols, mais plus sensibles à la cytotoxicité induite par la LDLox (275). Bref, les connaissances actuelles ne nous permettent pas de dire si l'une des lignées est plus adaptée que l'autre pour les études de cytotoxicité. Il aurait peut-être été plus approprié pour nous d'utiliser la lignée ARPE-19 pour une meilleure comparaison de nos résultats avec la littérature. Néanmoins, nos résultats obtenus avec les cellules hTERT RPE-1 étaient tout à fait en concordance avec les données disponibles dans la littérature qui ont été obtenues avec les cellules ARPE-19.

L'usage des lignées comme le hTERT RPE-1 et l'ARPE-19 comportent un grand facteur limitant : elles ne présentent pas les changements cellulaires associés à l'âge. Plusieurs chercheurs ont proposé d'induire le système antioxydant intrinsèque de la cellule pour protéger le RPE contre le stress oxydatif dans le contexte de la DMLA (164, 276-278), car le système semble s'affaiblir avec l'âge. En particulier, le système du Nfe2l2 est dérégulé avec l'âge chez la souris (64). Cependant, les cellules hTERT RPE-1 selon notre étude étaient capables de répondre rapidement au stress oxydatif par l'activation du NFE2L2. L'augmentation de l'expression protéique du *HMOX-1*, gène cible du NFE2L2, était déjà visible après 2 heures de traitement au NaIO_3 . L'effet antioxydant du MPE-001 ne semblait pas du tout être médié par une induction du système antioxydant chez cette lignée, mais il est possible que la réponse soit différente dans le cas des cellules du RPE d'un individu âgé qui a une défense antioxydante affaiblie. La dysfonction lysosomale, une autre caractéristique du vieillissement (62), pourrait également affecter l'effet protecteur du MPE-001 qui est médié par l'autophagie. Il aurait été pertinent de vérifier si le MPE-001 préserverait son effet protecteur chez des cellules du RPE

provenant d'un animal ou d'un humain âgé, et de confirmer à nouveau dans ce contexte l'implication du système antioxydant et de l'autophagie.

Le traitement au NaIO₃ est une méthode reproductible pour induire une cytotoxicité au niveau des cellules du RPE *in vitro* (64, 159-161) et *in vivo* (110, 160, 162-165). Il permet de reproduire plusieurs phénomènes contribuant au développement de la DMLA, à savoir le stress oxydatif, l'activation de l'inflammasome (110) et la dysfonction mitochondriale (110, 164). Nous avons découvert que le NaIO₃ cause également une dysfonction du flux autophagique, ce qui appuie l'utilisation des cellules du RPE en culture traitées par le NaIO₃ comme étant un modèle adéquat pour étudier le potentiel des agents pharmacologiques dans la DMLA. La majorité des études portant sur la cytotoxicité induite par le NaIO₃ *in vitro* ont été effectuées avec un traitement aigu (≤ 24 heures). Cependant, deux groupes de chercheurs ont plutôt proposé l'utilisation de traitement chronique à faibles concentrations, car il refléterait mieux le contexte pathologique et les protocoles de traitement de NaIO₃ employés *in vivo* (162, 163). Pour cette raison, nous avons vérifié l'effet protecteur du MPE-001 chez les cellules hTERT RPE-1 traitées de façon quotidienne pendant 72 h à de faibles concentrations de NaIO₃. Le facteur limitant majeur avec ce type de protocole est que les effets du NaIO₃ sur les divers marqueurs seraient beaucoup plus faibles. Il est approprié pour étudier les changements cellulaires comme la dysfonction lysosomale associée à une exposition prolongée au stress oxydatif (162), mais pas pour la mesure de ROS ou la détection de la mort cellulaire. Seule la viabilité cellulaire a été évaluée dans notre étude.

Nous sommes les premiers à avoir étudié l'implication du STX17 dans l'effet proautophagique d'un agent pharmacologique. Nous avons découvert que le co-traitement au MPE-001 et au NaIO₃ augmente l'expression du STX17 et la co-localisation des puncta de LC3B avec le STX17, ce qui était associé à une amélioration du flux autophagique. Itakura et coll. avait initialement découvert que le STX17 est uniquement recruté sur la membrane des autophagosomes matures, ce qui va permettre leur fusion avec les lysosomes (279). Or, Hamazaki et coll. (280) et Xian et coll. (281) ont découvert qu'il est impliqué dans les étapes précoces de la formation respective des autophagosomes et des mitophagosomes en recrutant la machinerie autophagique au niveau des sites de contact ER-mitochondrie. Ces études semblent contradictoires à celle d'Itakura et coll., mais Xian et coll. ont aussi observé que la formation des mitophagosomes induite par le carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone (CCCP) peut avoir

lieu en absence du STX17. Le rôle du STX17 dans l'autophagie pourrait dépendre du contexte. À la lumière de nos résultats, il n'est pas clair comment le MPE-001 augmente l'expression du STX17, ni si l'effet proautophagique du MPE-001 dépend de ce phénomène. La microscopie électronique nous aurait aidé à confirmer laquelle des étapes de l'autophagie est dérégulée par le NaIO₃, permettant ainsi de mieux comprendre le rôle du STX17 dans l'effet du MPE-001.

Nous avons démontré que le MPE-001 diminue la formation de superoxydes mitochondriaux induite par le NaIO₃ de façon dépendante de l'autophagie. La santé mitochondriale est maintenue par 1) sa biogenèse, 2) son remodelage par la fusion et sa fission et 3) sa dégradation par la mitophagie (282). Mis à part notre étude, deux autres études ont démontré que le NaIO₃ augmente la production de superoxydes mitochondriaux par les cellules du RPE (110, 163). Dans notre étude, nous avons également observé que l'augmentation de ROS mitochondriaux est plus grande que celle de ROS cellulaires totaux. Bizarrement, Chan *et al.* ont observé peu d'effet avec le traitement au NaIO₃ (30 mM) sur l'intensité de fluorescence du MitoSOX Red, indicateur de superoxydes mitochondriaux, mais ont tout de même observé une fragmentation mitochondriale dans les cellules ARPE-19 (165). Le dynamisme mitochondrial, le cycle répétitif de fusion et de fission, aide la mitochondrie à se débarrasser de ses composantes endommagées. L'équilibre entre la fusion et la fission détermine la morphologie du réseau mitochondrial et la susceptibilité au stress oxydatif, et la fission permet une meilleure élimination des mitochondries endommagées par la mitophagie (282). Nous avons seulement examiné l'effet du MPE-001 sur la mitophagie. La mesure des marqueurs de fission et de fusion et l'observation morphométrique du réseau mitochondrial auraient permis d'avoir une vue complète de l'effet du NaIO₃ et/ou MPE-001 sur le contrôle de la qualité mitochondriale. Le STX17 agit comme SNARE pour la fusion avec les lysosomes non seulement pour les autophagosomes, mais également pour les vésicules dérivées de la mitochondrie (283). La formation de vésicules dérivées de la mitochondrie est un processus additionnel de contrôle de la qualité mitochondriale qui a été découvert plus récemment. C'est une voie distincte de la mitophagie par laquelle la mitochondrie se débarrasse de ses composantes endommagées sous un stress oxydatif (284). Il aurait été intéressant de vérifier si la formation de ces vésicules est augmentée par le MPE-001 lors du stress oxydatif induit par le NaIO₃.

5. Perspectives

Mis à part les études sur le CD5L, il n'y a aucune autre étude à notre connaissance qui porte sur l'effet de l'activation du CD36 sur l'autophagie. De plus, les inducteurs de l'autophagie sont habituellement connus pour leur effet d'augmenter la formation des autophagosomes et non le flux autophagique. Comme travaux futurs, il serait intéressant de vérifier par quelle voie de signalisation les ligands du CD36 peuvent promouvoir l'autophagie.

Bien que nous ayons démontré les effets antioxydants et cytoprotecteurs du MPE-001 *in vitro*, l'effet du MPE-001 sur le stress oxydatif et l'autophagie devrait être confirmé *in vivo*. Un avantage du NaIO₃ est qu'il peut être utilisé chez les animaux en injection systémique pour produire une toxicité au niveau du RPE et subséquemment une dégénérescence des photorécepteurs (158). Il sera alors possible de vérifier l'effet du MPE-001 sur les marqueurs de stress oxydatif, de la mort cellulaire et de l'autophagie.

Des études ont montré que l'activation de l'inflammasome chez les cellules du RPE (110) et l'infiltration de cellules immunes dans l'espace sous-rétinien (161) sont associées à l'effet délétère du NaIO₃. Ces deux phénomènes sont observés dans la DMLA de forme sèche chez les humains (107, 285). Comme le CD36 est connu pour son rôle dans l'inflammation, il serait intéressant de vérifier l'effet des ligands du CD36 sur la réponse inflammatoire du RPE dans le contexte d'un stress oxydatif induit par le NaIO₃. Les dommages mitochondriaux étant connus comme activant l'inflammasome, il y a de fortes chances que le MPE-001 modulerait l'activation de l'inflammasome provoquée par le NaIO₃ et dans la DMLA.

6. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois qu'un ligand synthétique du récepteur éboueur CD36 peut induire l'autophagie dans les cellules du RPE, protégeant de cette façon ces cellules contre le stress oxydatif. Ces effets proautophagiques et cytoprotecteurs pourraient être en partie responsables de l'effet cytoprotecteur des ligands du CD36 dans la préservation des photorécepteurs *in vivo*. De plus, notre étude établit pour la première fois un lien direct entre l'activation du CD36 et le statut redox des cellules. La combinaison de l'effet modulateur des azapeptides dérivés du GHRP-6 sur l'inflammation, son effet sur la clairance des dépôts sous-rétiniens et son effet protecteur contre le stress oxydatif permet ainsi de suggérer le CD36 comme cible dans le traitement potentiel de la forme sèche de la DMLA.

Bibliographie

1. van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *The Journal of pathology*. 2014;232(2):151-64.
2. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *The British journal of ophthalmology*. 2012;96(5):614-8.
3. Mathenge W. Age-related macular degeneration. *Community eye health*. 2014;27(87):49-50.
4. Brody BL, Gamst AC, Williams RA, Smith AR, Lau PW, Dolnak D, et al. Depression, visual acuity, comorbidity, and disability associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2001;108(10):1893-900.
5. Rovner BW, Casten RJ. Activity Loss and Depression in Age-Related Macular Degeneration. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2002;10(3):305-10.
6. Berman K, Brodaty H. Psychosocial effects of age-related macular degeneration. *International psychogeriatrics*. 2006;18(3):415-28.
7. Augustin A, Sahel JA, Bandello F, Dardennes R, Maurel F, Negrini C, et al. Anxiety and depression prevalence rates in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(4):1498-503.
8. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2014;2(2):e106-e16.
9. Brown MM, Brown GC, Stein JD, Roth Z, Campanella J, Beauchamp GR. Age-related macular degeneration: economic burden and value-based medicine analysis. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2005;40(3):277-87.
10. Holmes D. Reconstructing the retina. *Nature*. 2018;561(7721):S2-s3.
11. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center 2005 [updated 2012 Jan 31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>.
12. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, Lipoproteins, and Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Lipids*. 2011;2011:14.
13. Alm A, Bill A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res*. 1973;15(1):15-29.
14. Provis JM, Penfold PL, Cornish EE, Sandercoe TM, Madigan MC. Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clinical & experimental optometry*. 2005;88(5):269-81.
15. Bone RA, Landrum JT, Tarsis SL. Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision Res*. 1985;25(11):1531-5.
16. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *The Journal of comparative neurology*. 1990;292(4):497-523.
17. Curcio CA, Owsley C, Jackson GR. Spare the Rods, Save the Cones in Aging and Age-related Maculopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(8):2015-8.
18. Jonas JB, Schneider U, Naumann GO. Count and density of human retinal photoreceptors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1992;230(6):505-10.

19. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS. Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of medicine*. 2006;38(7):450-71.
20. Sung C-H, Chuang J-Z. The cell biology of vision. *The Journal of Cell Biology*. 2010;190(6):953.
21. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*. 2005;85(3):845-81.
22. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiology*. 2010;25(1):8-15.
23. LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*. 1976;194(4269):1071-4.
24. Blanks JC, Pickford MS, Organisciak DT. Ascorbate treatment prevents accumulation of phagosomes in RPE in light damage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1992;33(10):2814-21.
25. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Human molecular genetics*. 2000;9(4):645-51.
26. Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, et al. Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *The American journal of pathology*. 2002;161(4):1515-24.
27. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking α 5 integrin. *J Exp Med*. 2004;200(12):1539-45.
28. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E. Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit. In: Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors. *The Eye (Fourth Edition)*: W.B. Saunders; 2016. p. 1-102.e2.
29. The Eye Diseases Prevalence Research G. Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. *Archives of Ophthalmology*. 2004;122(4):564-72.
30. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, et al. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology*. 2006;90(1):75-80.
31. Sperduto RD, Hiller R. Systemic Hypertension and Age-Related Maculopathy in the Framingham Study. *JAMA Ophthalmology*. 1986;104(2):216-9.
32. Klaver CCW, Wolfs RCW, Assink JJM, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PTVM. Genetic Risk of Age-related Maculopathy: Population-Based Familial Aggregation Study. *Archives of Ophthalmology*. 1998;116(12):1646-51.
33. Goldberg J, Flowerdew G, Smith E, Brody JA, Tso MOM. FACTORS ASSOCIATED WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: AN ANALYSIS OF DATA FROM THE FIRST NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY. *American Journal of Epidemiology*. 1988;128(4):700-10.
34. Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, VandenLangenberg GM, Klein BEK, Palta M. Dietary Fat and Age-Related Maculopathy. *JAMA Ophthalmology*. 1995;113(6):743-8.
35. Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PTVM. Age-related Macular Degeneration Is Associated with Atherosclerosis: The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology*. 1995;142(4):404-9.

36. Vanderbeek BL, Zacks DN, Talwar N, Nan B, Musch DC, Stein JD. Racial differences in age-related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. *American journal of ophthalmology*. 2011;152(2):273-82.e3.
37. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2012;119(3):571-80.
38. Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genetic epidemiology*. 1994;11(1):51-67.
39. Grizzard WS, Arnett D, Haag SL. Twin study of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Epidemiology*. 2003;10(5):315-22.
40. The AMDGC, Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics*. 2013;45:433.
41. Grassmann F, Heid IM, Weber BHF, International AMDGC. Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration. *Genetics*. 2017;205(2):919-24.
42. Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology*. 1985;92(5):615-27.
43. AAO Retina/Vitreous PPP Panel HCfQEC. Age-Related Macular Degeneration PPP - Updated 2015: American Academy of Ophthalmology; 2015 [cited 2019 April].
44. Ferris FL, 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(4):844-51.
45. Mukesh BN, Dimitrov PN, Leikin S, Wang JJ, Mitchell P, McCarty CA, et al. Five-year incidence of age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Ophthalmology*. 2004;111(6):1176-82.
46. Hernandez-Zimbron LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De la Paz L, Velez-Montoya R, Zenteno E, Gulas-Canizo R, et al. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:14.
47. Bhutto I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(4):295-317.
48. Funk M, Karl D, Georgopoulos M, Benesch T, Sacu S, Polak K, et al. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology*. 2009;116(12):2393-9.
49. Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*. 2012;75(1):26-39.
50. Pegaptanib: Wolters Kluwer Clinical Drug Information Inc. c2019; [cited 2019 August 14]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/drugs.aspx#monoNumber=425189§ionID=00&tab=tab0>.
51. Ranibizumab: Wolters Kluwer Clinical Drug Information Inc. c2019; [cited 2019 August 14]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/drugs.aspx#monoNumber=425333§ionID=00&tab=tab0>.

52. Afibercept: Wolters Kluwer Clinical Drug Information, Inc. c2019; [cited 2019 August 14]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/drugs.aspx?gbosID=132823>.
53. Zhang X, Lai TYY. Baseline Predictors of Visual Acuity Outcome in Patients with Wet Age-Related Macular Degeneration. *BioMed research international*. 2018;2018:9640131.
54. Shen L, Liu F, Grossetta Nardini H, Del Priore LV. Natural History of Geographic Atrophy in Untreated Eyes with Nonexudative Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology Retina*. 2018;2(9):914-21.
55. Sayegh RG, Sacu S, Dunavölgyi R, Kroh ME, Roberts P, Mitsch C, et al. Geographic Atrophy and Foveal-Sparing Changes Related to Visual Acuity in Patients With Dry Age-Related Macular Degeneration Over Time. *American Journal of Ophthalmology*. 2017;179:118-28.
56. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (London, England)*. 1988;2 (Pt 5):552-77.
57. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *The British journal of ophthalmology*. 1976;60(5):324-41.
58. von Ruckmann A, Fitzke FW, Bird AC. Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997;38(2):478-86.
59. Bird AC, Phillips RL, Hageman GS. Geographic atrophy: a histopathological assessment. *JAMA ophthalmology*. 2014;132(3):338-45.
60. Wang JJ, Foran S, Smith W, Mitchell P. Risk of Age-Related Macular Degeneration in Eyes With Macular Drusen or Hyperpigmentation: The Blue Mountains Eye Study Cohort. *JAMA Ophthalmology*. 2003;121(5):658-63.
61. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:201-18.
62. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *European Journal of Biochemistry*. 2002;269(8):1996-2002.
63. Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free radical biology & medicine*. 2015;88(Pt B):314-36.
64. Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res*. 2014;119:111-4.
65. He Y, Ge J, Burke JM, Myers RL, Dong ZZ, Tombran-Tink J. Mitochondria impairment correlates with increased sensitivity of aging RPE cells to oxidative stress. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*. 2010;3(3):92-108.
66. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review. *Eye*. 1995;9(6):763-71.
67. Vives-Bauza C, Anand M, Shiraz AK, Magrane J, Gao J, Vollmer-Snarr HR, et al. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(36):24770-80.
68. Bergmann M, Schutt F, Holz FG, Kopitz J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(3):562-4.

69. Del Priore LV, Kuo Y-H, Tezel TH. Age-Related Changes in Human RPE Cell Density and Apoptosis Proportion In Situ. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(10):3312-8.
70. Decanini A, Nordgaard CL, Feng X, Ferrington DA, Olsen TW. Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(4):607-15.
71. Canter JA, Olson LM, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Anderson B, Hauser MA, et al. Mitochondrial DNA polymorphism A4917G is independently associated with age-related macular degeneration. *PloS one*. 2008;3(5):e2091-e.
72. SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK, Elashoff M, Clemons TE, Reed GF, et al. Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. *PloS one*. 2009;4(5):e5508-e.
73. Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A. SOD2 gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Molecular vision*. 2009;15:1819-26.
74. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11282-7.
75. Zhao Z, Chen Y, Wang J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, et al. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PloS one*. 2011;6(4):e19456-e.
76. Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, Zhan X, Crabb JW, Kim SR, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(10):4407-20.
77. Age-Related Eye Disease Study 2 Research G. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Jama*. 2013;309(19):2005-15.
78. Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG, Kopitz J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(3):1342-7.
79. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(23):14682-7.
80. Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(8):3663-8.
81. Marie M, Bigot K, Angebault C, Barrau C, Gondouin P, Pagan D, et al. Light action spectrum on oxidative stress and mitochondrial damage in A2E-loaded retinal pigment epithelium cells. *Cell death & disease*. 2018;9(3):287-.
82. Lakkaraju A, Finnemann SC, Rodriguez-Boulton E. The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(26):11026.
83. Zhang J, Bai Y, Huang L, Qi Y, Zhang Q, Li S, et al. Protective effect of autophagy on human retinal pigment epithelial cells against lipofuscin fluorophore A2E: implications for age-related macular degeneration. *Cell death & disease*. 2015;6:e1972.

84. Penn J, Mihai DM, Washington I. Morphological and physiological retinal degeneration induced by intravenous delivery of vitamin A dimers in rabbits. *Disease Models & Mechanisms*. 2015;8(2):131.
85. Hahn P, Ying GS, Beard J, Dunaief JL. Iron levels in human retina: sex difference and increase with age. *Neuroreport*. 2006;17(17):1803-6.
86. Biesemeier A, Yoeurck E, Eibl O, Schraermeyer U. Iron accumulation in Bruch's membrane and melanosomes of donor eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2015;137:39-49.
87. Song D, Dunaief JL. Retinal iron homeostasis in health and disease. *Front Aging Neurosci*. 2013;5:24-.
88. Yefimova MG, Jeanny JC, Keller N, Sergeant C, Guillonneau X, Beaumont C, et al. Impaired retinal iron homeostasis associated with defective phagocytosis in Royal College of Surgeons rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(2):537-45.
89. Rogers BS, Symons RC, Komeima K, Shen J, Xiao W, Swaim ME, et al. Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(1):438-45.
90. Wolkow N, Song Y, Wu TD, Qian J, Guerquin-Kern JL, Dunaief JL. Aceruloplasminemia: retinal histopathologic manifestations and iron-mediated melanosome degradation. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2011;129(11):1466-74.
91. Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):438-51.
92. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5720):385-9.
93. Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11830-5.
94. Yamada Y, Tian J, Yang Y, Cutler RG, Wu T, Telljohann RS, et al. Oxidized low density lipoproteins induce a pathologic response by retinal pigmented epithelial cells. *Journal of neurochemistry*. 2008;105(4):1187-97.
95. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(7):835-46.
96. Kim S-Y. Retinal phagocytes in age-related macular degeneration. *Macrophage (Houst)*. 2015;2(1):e698.
97. McLeod DS, Bhutto I, Edwards MM, Silver RE, Seddon JM, Luttly GA. Distribution and Quantification of Choroidal Macrophages in Human Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(14):5843-55.
98. Detrick B, Hooks JJ. Immune regulation in the retina. *Immunologic Research*. 2010;47(1):153-61.
99. Bradley DT, Zipfel PF, Hughes AE. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. *Eye*. 2011;25:683.

100. Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, Lundh P, Pickering MC, Sethi C, et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(42):16651.
101. Cashman SM, Desai A, Ramo K, Kumar-Singh R. Expression of Complement Component 3 (C3) from an Adenovirus Leads to Pathology in the Murine Retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(6):3436-45.
102. Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Borncke F, et al. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2008;3(7):e2593.
103. Ebrahimi KB, Fijalkowski N, Cano M, Handa JT. Decreased membrane complement regulators in the retinal pigmented epithelium contributes to age-related macular degeneration. *The Journal of pathology*. 2013;229(5):729-42.
104. Kim YH, He S, Kase S, Kitamura M, Ryan SJ, Hinton DR. Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(5):651-9.
105. Bhutto IA, Baba T, Merges C, Juriasinghani V, McLeod DS, Luty GA. C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology*. 2011;95(9):1323-30.
106. Chen M, Forrester JV, Xu H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res*. 2007;84(4):635-45.
107. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, et al. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(1):110-20.
108. Brandstetter C, Mohr LK, Latz E, Holz FG, Krohne TU. Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2015;93(8):905-16.
109. Anderson OA, Finkelstein A, Shima DT. A2E induces IL-1beta production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome. *PLoS One*. 2013;8(6):e67263.
110. Mao X, Pan T, Shen H, Xi H, Yuan S, Liu Q. The rescue effect of mesenchymal stem cell on sodium iodate-induced retinal pigment epithelial cell death through deactivation of NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;103:517-23.
111. Wang K, Yao Y, Zhu X, Zhang K, Zhou F, Zhu L. Amyloid beta induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via NADPH oxidase- and mitochondria-dependent ROS production. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2017;31(6).
112. Gao J, Cui JZ, To E, Cao S, Matsubara JA. Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):15-.
113. Saeed AM, Duffort S, Ivanov D, Wang H, Laird JM, Salomon RG, et al. The Oxidative Stress Product Carboxyethylpyrrole Potentiates TLR2/TLR1 Inflammatory Signaling in Macrophages. *PLOS ONE*. 2014;9(9):e106421.
114. Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):42027-35.

115. Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature medicine*. 2008;14(2):194-8.
116. van Leeuwen EM, Emri E, Merle BMJ, Colijn JM, Kersten E, Cougnard-Gregoire A, et al. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2018;67:56-86.
117. van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Bosman FT, de Jong PT. Immunohistochemical light and electron microscopy of basal laminar deposit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1994;32(1):40-6.
118. Curcio CA, Millican CL. Basal Linear Deposit and Large Drusen Are Specific for Early Age-Related Maculopathy. *JAMA Ophthalmology*. 1999;117(3):329-39.
119. Huang JD, Curcio CA, Johnson M. Morphometric analysis of lipoprotein-like particle accumulation in aging human macular Bruch's membrane. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(6):2721-7.
120. Li CM, Chung BH, Presley JB, Malek G, Zhang X, Dashti N, et al. Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(7):2576-86.
121. Curcio CA, Messinger JD, Sloan KR, McGwin G, Medeiros NE, Spaide RF. SUBRETINAL DRUSENOID DEPOSITS IN NON-NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: Morphology, Prevalence, Topography, and Biogenesis Model. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2013;33(2).
122. Huisinigh C, McGwin G, Jr., Neely D, Zarubina A, Clark M, Zhang Y, et al. The Association Between Subretinal Drusenoid Deposits in Older Adults in Normal Macular Health and Incident Age-Related Macular Degeneration Subretinal Drusenoid Deposits and Incident AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(2):739-45.
123. Rudolf M, Malek G, Messinger JD, Clark ME, Wang L, Curcio CA. Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: organization and composition. *Exp Eye Res*. 2008;87(5):402-8.
124. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001;20(6):705-32.
125. Tan LX, Toops KA, Lakkaraju A. Protective responses to sublytic complement in the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(31):8789.
126. Dasari B, Prasanthi JR, Marwarha G, Singh BB, Ghribi O. The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases beta-amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *BMC ophthalmology*. 2010;10:22.
127. Joffre C, Leclerc L, Buteau B, Martine L, Cabaret S, Malvitte L, et al. Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*. 2007;32(3):271-80.
128. Barot M, Gokulgandhi MR, Mitra AK. Mitochondrial dysfunction in retinal diseases. *Current eye research*. 2011;36(12):1069-77.
129. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal*. 2012;441(2):523-40.

130. Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(5):a012641-a.
131. Lin H, Xu H, Liang F-Q, Liang H, Gupta P, Havey AN, et al. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2011;52(6):3521-9.
132. Karunadharma PP, Nordgaard CL, Olsen TW, Ferrington DA. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010;51(11):5470-9.
133. Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Balacco Gabrieli C. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiology of aging.* 2006;27(7):983-93.
134. Ferrington DA, Ebeling MC, Kapphahn RJ, Terluk MR, Fisher CR, Polanco JR, et al. Altered bioenergetics and enhanced resistance to oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells from donors with age-related macular degeneration. *Redox Biol.* 2017;13:255-65.
135. Kaarniranta K, Sinha D, Blasiak J, Kauppinen A, Veréb Z, Salminen A, et al. Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy.* 2013;9(7):973-84.
136. Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy.* 2014;10(11):1989-2005.
137. Golestaneh N, Chu Y, Xiao Y-Y, Stoleru GL, Theos AC. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell death & disease.* 2017;8(1):e2537-e.
138. Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol.* 2014;2:82-90.
139. Mitter SK, Rao HV, Qi X, Cai J, Sugrue A, Dunn WA, et al. Autophagy in the Retina: A Potential Role in Age-Related Macular Degeneration. *Advances in experimental medicine and biology.* 2012;723:83-90.
140. Liu J, Copland DA, Theodoropoulou S, Chiu HAA, Barba MD, Mak KW, et al. Impairing autophagy in retinal pigment epithelium leads to inflammasome activation and enhanced macrophage-mediated angiogenesis. *Scientific Reports.* 2016;6:20639.
141. Zhang Y, Cross SD, Stanton JB, Marmorstein AD, Le YZ, Marmorstein LY. Early AMD-like defects in the RPE and retinal degeneration in aged mice with RPE-specific deletion of Atg5 or Atg7. *Molecular vision.* 2017;23:228-41.
142. Rubinsztein David C, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and Aging. *Cell.* 2011;146(5):682-95.
143. Kuznetsova AV, Kurinov AM, Aleksandrova MA. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium. *J Ophthalmol.* 2014;2014:801787-.
144. Strunnikova NV, Maminishkis A, Barb JJ, Wang F, Zhi C, Sergeev Y, et al. Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium. *Human molecular genetics.* 2010;19(12):2468-86.
145. Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, Ahmad A, Takeuchi K, Morioka E, et al. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca(2+) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Scientific reports.* 2017;7:44175-.

146. Finnemann SC, Silverstein RL. Differential roles of CD36 and $\alpha\beta$ 5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J Exp Med*. 2001;194(9):1289-98.
147. Gong X, Harrell M, Mitchell D, Sundin O, Rubin L. A new human retinal pigment epithelial cell model for interrogating the protective functions of xanthophylls in retinopathies (39.2). *The FASEB Journal*. 2014;28(1_supplement):39.2.
148. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996;62(2):155-69.
149. Rambhatla L, Chiu CP, Glickman RD, Rowe-Rendleman C. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(5):1622-30.
150. Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(8):3644-55.
151. Garcia TY, Gutierrez M, Reynolds J, Lamba DA. Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human ESC and iPSC-Derived RPE Cells. *Dynamic AMD-Associated Oxidative Stress Changes IOVS | Month Year | Vol. 56 | No. 12 | page number*. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(12):7480-8.
152. Hanus J, Zhang H, Wang Z, Liu Q, Zhou Q, Wang S. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death & Disease*. 2013;4:e965.
153. Ye Z, He S-Z, Li Z-H. Effect of A β protein on inhibiting proliferation and promoting apoptosis of retinal pigment epithelial cells. *Int J Ophthalmol*. 2018;11(6):929-34.
154. Yating Q, Yuan Y, Wei Z, Qing G, Xingwei W, Qiu Q, et al. Oxidized LDL induces apoptosis of human retinal pigment epithelium through activation of ERK-Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Curr Eye Res*. 2015;40(4):415-22.
155. Wielgus AR, Chignell CF, Ceger P, Roberts JE. Comparison of A2E cytotoxicity and phototoxicity with all-trans-retinal in human retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*. 2010;86(4):781-91.
156. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, Hernandez EP, Marin-Castano ME, Cousins SW. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(2):729-37.
157. Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Alexandridou A, Sall J, Dubovy S, Csaky K. The Role of Aging, High Fat Diet and Blue Light Exposure in an Experimental Mouse Model for Basal Laminar Deposit Formation. *Experimental Eye Research*. 2002;75(5):543-53.
158. Sorsby A. EXPERIMENTAL PIGMENTARY DEGENERATION OF THE RETINA BY SODIUM IODATE. *The British journal of ophthalmology*. 1941;25(2):58-62.
159. Liu C-N, Peng Q, W Yates D, Huang W, Devantier H, Aguirre S. Ocular Safety Assessment of Sodium Iodate in Cynomolgus Monkeys: Characterization of a Classic Retinal Toxicant 2016.
160. Hanus J, Anderson C, Sarraf D, Ma J, Wang S. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discov*. 2016;2:16054.
161. Moriguchi M, Nakamura S, Inoue Y, Nishinaka A, Nakamura M, Shimazawa M, et al. Irreversible Photoreceptors and RPE Cells Damage by Intravenous Sodium Iodate in Mice Is Related to Macrophage Accumulation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2018;59(8):3476-87.

162. Lin Y-C, Horng L-Y, Sung H-C, Wu R-T. Sodium Iodate Disrupted the Mitochondrial-Lysosomal Axis in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;34(7):500-11.
163. Zhang X-Y, Ng TK, Brelén ME, Wu D, Wang JX, Chan KP, et al. Continuous exposure to non-lethal doses of sodium iodate induces retinal pigment epithelial cell dysfunction. *Scientific Reports*. 2016;6:37279.
164. Saito Y, Kuse Y, Inoue Y, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. Transient acceleration of autophagic degradation by pharmacological Nrf2 activation is important for retinal pigment epithelium cell survival. *Redox Biol*. 2018;19:354-63.
165. Chan C-M, Huang D-Y, Sekar P, Hsu S-H, Lin W-W. Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):40-.
166. Saito Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Nishimura Y, Tanaka T, Hara H. Establishment of a drug evaluation model against light-induced retinal degeneration using adult pigmented zebrafish. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2016;131(3):215-8.
167. Ramkumar HL, Zhang J, Chan CC. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(3):169-90.
168. Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(4):487-509.
169. Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, Mills SA, Waugh M, Ho T, et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 2014;91(8):878-86.
170. Gouras P, Ivert L, Landauer N, Mattison JA, Ingram DK, Neuringer M. Drusenoid maculopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): effects of age and gender. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2008;246(10):1395-402.
171. Ishibashi T, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Pathogenesis of drusen in the primate. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1986;27(2):184-93.
172. Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A, Terao K, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(12):1683-5.
173. Francis PJ, Appukuttan B, Simmons E, Landauer N, Stoddard J, Hamon S, et al. Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease. *Human molecular genetics*. 2008;17(17):2673-80.
174. Dawson WW, Dawson JC, Lake KP, Gonzalez-Martinez J. Maculas, monkeys, models, AMD and aging. *Vision Research*. 2008;48(3):360-5.
175. Ou Q, Zhu T, Li P, Li Z, Wang L, Lian C, et al. Establishment of Retinal Degeneration Model in Rat and Monkey by Intravitreal Injection of Sodium Iodate. *Current molecular medicine*. 2018;18(6):352-64.
176. Ufret-Vincenty RL, Aredo B, Liu X, McMahon A, Chen PW, Sun H, et al. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(11):5878-87.

177. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nature medicine*. 2003;9(11):1390-7.
178. Luhmann UF, Robbie S, Munro PM, Barker SE, Duran Y, Luong V, et al. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(12):5934-43.
179. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2920-8.
180. Tuo J, Bojanowski CM, Zhou M, Shen D, Ross RJ, Rosenberg KI, et al. Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(8):3827-36.
181. Felszeghy S, Viiri J, Paterno JJ, Hyttinen JMT, Koskela A, Chen M, et al. Loss of NRF-2 and PGC-1 α genes leads to retinal pigment epithelium damage resembling dry age-related macular degeneration. *Redox Biol*. 2018;20:1-12.
182. Zhang M, Chu Y, Mowery J, Konkell B, Galli S, Theos AC, et al. Pgc-1 α repression and high-fat diet induce age-related macular degeneration-like phenotypes in mice. *Disease models & mechanisms*. 2018;11(9):dmm032698.
183. Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, Shang F, Caceres A, Pawlak D, et al. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging cell*. 2012;11(1):1-13.
184. Weikel KA, Fitzgerald P, Shang F, Caceres MA, Bian Q, Handa JT, et al. Natural history of age-related retinal lesions that precede AMD in mice fed high or low glycemic index diets. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(2):622-32.
185. Dithmar S, Curcio CA, Le NA, Brown S, Grossniklaus HE. Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(8):2035-42.
186. Malek G, Johnson LV, Mace BE, Saloupis P, Schmechel DE, Rickman DW, et al. Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: A model for age-related retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(33):11900.
187. Kliffen M, Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Mooy CM, de Jong PT. The APO(*)E3-Leiden mouse as an animal model for basal laminar deposit. *The British journal of ophthalmology*. 2000;84(12):1415-9.
188. Fujihara M, Bartels E, Nielsen LB, Handa JT. A human apoB100 transgenic mouse expresses human apoB100 in the RPE and develops features of early AMD. *Experimental eye research*. 2009;88(6):1115-23.
189. Rudolf M, Winkler B, Aherrahou Z, Doebling LC, Kaczmarek P, Schmidt-Erfurth U. Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *The British journal of ophthalmology*. 2005;89(12):1627-30.
190. Picard E, Houssier M, Bujold K, Sapieha P, Lubell W, Dorfman A, et al. CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging*. 2010;2(12):981-9.

191. Houssier M, Raoul W, Lavalette S, Keller N, Guillonnet X, Baragatti B, et al. CD36 Deficiency Leads to Choroidal Involution via COX2 Down-Regulation in Rodents. *PLoS medicine*. 2008;5(2):e39.
192. Storti F, Klee K, Todorova V, Steiner R, Othman A, van der Velde-Visser S, et al. Impaired ABCA1/ABCG1-mediated lipid efflux in the mouse retinal pigment epithelium (RPE) leads to retinal degeneration. *eLife*. 2019;8.
193. Takada Y, Uyama M, Ohkuma H, Ogata N, Matsushima M, Deguchi J, et al. [Immunohistological study in Bruch's membrane of senescence accelerated mouse]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*. 1994;98(10):955-61.
194. Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*. 2011;471:325.
195. Yao J, Jia L, Khan N, Lin C, Mitter SK, Boulton ME, et al. Deletion of autophagy inducer RB1CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium. *Autophagy*. 2015;11(6):939-53.
196. Age-Related Eye Disease Study Research G. A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. *JAMA Ophthalmology*. 2001;119(10):1417-36.
197. Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report number 3. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2224-32.
198. Evans J. Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis. *Eye*. 2008;22:751.
199. Evans JB, Syed BA. New hope for dry AMD? *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(7):501-2.
200. Cheng W-S, Lu D-W, Chiang C-H, Chang C-J. Overview of clinical trials for dry age-related macular degeneration. *Journal of Medical Sciences*. 2017;37(4):121-9.
201. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science signaling*. 2009;2(72):re3-re.
202. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(6):785-91.
203. Talle MA, Rao PE, Westberg E, Allegar N, Makowski M, Mittler RS, et al. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cellular immunology*. 1983;78(1):83-99.
204. Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA. Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(13):7570-5.
205. Yang X, Okamura DM, Lu X, Chen Y, Moorhead J, Varghese Z, et al. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13:769.
206. Luiken JJFP, Chanda D, Nabben M, Neumann D, Glatz JFC. Post-translational modifications of CD36 (SR-B2): Implications for regulation of myocellular fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(12):2253-8.
207. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *The Journal of membrane biology*. 1996;153(1):75-81.

208. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38517-23.
209. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(27):16221-4.
210. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(16):11811-6.
211. Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ. CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(25):18244-50.
212. Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, et al. CD36, a Class B Scavenger Receptor, Is Expressed on Microglia in Alzheimer's Disease Brains and Can Mediate Production of Reactive Oxygen Species in Response to β -Amyloid Fibrils. *The American journal of pathology*. 2002;160(1):101-12.
213. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2006;203(12):2613.
214. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(5):3195-202.
215. Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, et al. Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis, and Pathogen-Induced JNK-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology*. 2008;181(10):7147.
216. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005;433(7025):523-7.
217. Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*. 2005;170(3):477-85.
218. Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(19):14501-8.
219. Ring A, Le Lay S, Pohl J, Verkade P, Stremmel W. Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006;1761(4):416-23.
220. Githaka JM, Vega AR, Baird MA, Davidson MW, Jaqaman K, Touret N. Ligand-induced growth and compaction of CD36 nanoclusters enriched in Fyn induces Fyn signaling. *Journal of Cell Science*. 2016;129(22):4175.
221. Jaqaman K, Kuwata H, Touret N, Collins R, Trimble WS, Danuser G, et al. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell*. 2011;146(4):593-606.
222. Okumura T, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *The Journal of biological chemistry*. 1976;251(19):5944-9.

223. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood*. 1990;76(12):2501-9.
224. Glatz JFC, Luiken JJFP. From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie*. 2017;136:21-6.
225. Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y, et al. Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*. 2002;51(10):3113-9.
226. Bujold K, Rhainds D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H. CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):457-64.
227. Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(42):32523-9.
228. Bonen A, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Heigenhauser GJ. The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *International journal of obesity (2005)*. 2006;30(6):877-83.
229. Yang J, Park KW, Cho S. Inhibition of the CD36 receptor reduces visceral fat accumulation and improves insulin resistance in obese mice carrying the BDNF-Val66Met variant. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(34):13338-48.
230. Corpeleijn E, van der Kallen CJ, Kruijschoop M, Magagnin MG, de Bruin TW, Feskens EJ, et al. Direct association of a promoter polymorphism in the CD36/FAT fatty acid transporter gene with Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23(8):907-11.
231. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet (London, England)*. 2001;357(9257):686-7.
232. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*. 2016;157(2):570-85.
233. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56(12):2863-71.
234. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell metabolism*. 2006;4(3):211-21.
235. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res*. 2008;78(1):185-96.
236. Uematsu S, Akira S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol*. 2008(183):1-20.
237. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010;11(2):155-61.
238. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of

- soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol.* 2013;14(8):812-20.
239. Sarrias MR, Padilla O, Monreal Y, Carrascal M, Abian J, Vives J, et al. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue antigens.* 2004;63(4):335-44.
240. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, et al. LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response. *Cell.* 2004;119(2):299-309.
241. Gebe JA, Kiener PA, Ring HZ, Li X, Francke U, Aruffo A. Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpa, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(10):6151-8.
242. Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, et al. Circulating AIM as an Indicator of Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Humans. *PLOS ONE.* 2014;9(10):e109123.
243. Kurokawa J, Arai S, Nakashima K, Nagano H, Nishijima A, Miyata K, et al. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab.* 2010;11(6):479-92.
244. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, Valledor AF, Sarrias MR. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *J Leukoc Biol.* 2015;98(2):173-84.
245. Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, et al. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell Metab.* 2005;1(3):201-13.
246. Amezcua N, Sanjurjo L, Julve J, Aran G, Perez-Cabezas B, Bastos-Amador P, et al. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake. *J Leukoc Biol.* 2014;95(3):509-20.
247. Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, Naranjo-Gómez M, Arias L, Armengol C, et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy.* 2015;11(3):487-502.
248. Haruta I, Kato Y, Hashimoto E, Minjares C, Kennedy S, Uto H, et al. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(25):22910-4.
249. Sanjurjo L, Amezcua N, Vilaplana C, Caceres N, Marzo E, Valeri M, et al. The scavenger protein apoptosis inhibitor of macrophages (AIM) potentiates the antimicrobial response against *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing autophagy. *PLoS One.* 2013;8(11):e79670.
250. Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T, Arai S, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(29):12072-7.
251. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature medicine.* 2000;6(1):41-8.

252. Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, Lee JW, Fliesler SJ, Rodriguez IR. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Molecular vision*. 2006;12:1319-33.
253. Mazzoni F, Safa H, Finnemann SC. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Experimental eye research*. 2014;126:51-60.
254. Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*. 1996;109 (Pt 2):387-95.
255. Sun M, Finnemann SC, Febbraio M, Shan L, Annangudi SP, Podrez EA, et al. Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(7):4222-30.
256. Li S, Lam TT, Fu J, Tso MO. Systemic hypertension exaggerates retinal photic injury. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 1995;113(4):521-6.
257. Bowers CY. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1998;54(12):1316-29.
258. Deghenghi R, Cananzi MM, Torsello A, Battisti C, Muller EE, Locatelli V. GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats. *Life sciences*. 1994;54(18):1321-8.
259. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circulation research*. 2002;90(8):844-9.
260. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, et al. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *The Biochemical journal*. 2004;382(Pt 2):417-24.
261. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S, et al. A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Up-Regulates Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages through a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Pathway. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(12):3165-78.
262. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, et al. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(13):1869-71.
263. Proulx C, Sabatino D, Hopewell R, Spiegel J, Garcia Ramos Y, Lubell WD. Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Medicinal Chemistry*. 2011;3(9):1139-64.
264. Sabatino D, Proulx C, Klocek S, Bourguet CB, Boeglin D, Ong H, et al. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Organic Letters*. 2009;11(16):3650-3.
265. Proulx C, Picard É, Boeglin D, Pohankova P, Chemtob S, Ong H, et al. Azapeptide Analogues of the Growth Hormone Releasing Peptide 6 as Cluster of Differentiation 36 Receptor Ligands with Reduced Affinity for the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;55(14):6502-11.
266. Ong HUY, Chemtob S, Lubell W, Sennlaub F, Boeglin D, Proulx C, et al., inventors; ONG HUY, CHEMTOB SYLVAIN, LUBELL WILLIAM, SENNLAUB FLORIAN,

BOEGLIN DAMIEN, PROULX CAROLINE, SAJJADI ZOHREH, SABATINO DAVID, VALORISATION RECHERCHE LTD PARTNERSHIP, VALORISATION HSJ LTD PARTNERSHIP, assignee. Azapeptides As Cd36 Binding Compounds. US patent US 8435954 B2. 2013 2008/06/18.

267. Howes KA, Liu Y, Dunaief JL, Milam A, Frederick JM, Marks A, et al. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(10):3713-20.

268. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2002;120(11):1435-42.

269. Turcotte S, Mellal K, Chingle R, Mulumba M, Omri S, Dif-Yaiche L, et al. Azasulfurylpeptide Modulation of CD36-Mediated Inflammation Without Effect on Neovascularization. *Biomedicines*. 2018;6(4):98.

270. Cho S, Park E-M, Febbraio M, Anrather J, Park L, Racchumi G, et al. The Class B Scavenger Receptor CD36 Mediates Free Radical Production and Tissue Injury in Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25(10):2504.

271. Cho S, Szeto HH, Kim E, Kim H, Tolhurst AT, Pinto JT. A Novel Cell-permeable Antioxidant Peptide, SS31, Attenuates Ischemic Brain Injury by Down-regulating CD36. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(7):4634-42.

272. Huynh DN, Bessi VL, Ménard L, Piquereau J, Proulx C, Febbraio M, et al. Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice. *The FASEB Journal*. 2018;32(2):807-18.

273. Mwaikambo BR, Yang C, Chemtob S, Hardy P. Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(39):26695-707.

274. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *Journal of proteome research*. 2006;5(4):862-78.

275. Rodriguez IR, Alam S, Lee JW. Cytotoxicity of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Cultured RPE Cells Is Dependent on the Formation of 7-Ketocholesterol. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(8):2830-7.

276. Sternberg P, Jr., Davidson PC, Jones DP, Hagen TM, Reed RL, Drews-Botsch C. Protection of retinal pigment epithelium from oxidative injury by glutathione and precursors. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1993;34(13):3661-8.

277. Hanus J, Kolkin A, Chimienti J, Botsay S, Wang S. 4-Acetoxyphenol Prevents RPE Oxidative Stress-Induced Necrosis by Functioning as an NRF2 Stabilizer4-AC Protects Oxidative Stress-Induced RPE Cell Necrosis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(9):5048-59.

278. Satish S, Philipose H, Rosales MAB, Saint-Geniez M. Pharmaceutical Induction of PGC-1 α Promotes Retinal Pigment Epithelial Cell Metabolism and Protects against Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:9248640-.

279. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012;151(6):1256-69.

280. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013;495(7441):389-93.

281. Xian H, Yang Q, Xiao L, Shen H-M, Liou Y-C. STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism. *Nature Communications*. 2019;10(1):2059.
282. Valera-Alberni M, Canto C. Mitochondrial stress management: a dynamic journey. *Cell Stress*. 2018;2(10):253-74.
283. McLelland GL, Lee SA, McBride HM, Fon EA. Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. *J Cell Biol*. 2016;214(3):275-91.
284. Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO journal*. 2014;33(19):2142-56.
285. Lad EM, Cousins SW, Van Arnam JS, Proia AD. Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(11):1941-5.

Annexe 1. Curriculum Vitae

EDUCATION AND DIPLOMA

Master in Pharmaceutical Sciences

Université de Montréal, Montréal, QC
Average GPA : 4.113 on 4.3

Sept. 2017-Ongoing

Doctorat de Premier Cycle en Pharmacie (Pharm.D.)

Université de Montréal, Montréal, QC
Average GPA : 3.792 on 4.3

*August 2015-Abandoned
in May 2017*

Bachelor of Science - Honours in Pharmacology

McGill University, Montreal, QC
Average GPA : 4.0 on 4.0

Sept. 2012-May 2015

RESEARCH EXPERIENCE

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, QC
Graduate student (Master's); Supervisor : Dr. Huy Ong

August 2017-Ongoing

The antioxidant effect of the CD36 ligand MPE-001 in the cytoprotection of retinal pigment epithelium

- Oxidative damages to the retinal pigment epithelium play an important role in the pathogenesis of age-related macular degeneration. We aimed to study the potential antioxidant and cytoprotective effect of the CD36 ligand MPE-001 in retinal pigment epithelium.
- Techniques : Western blot, qRT-PCR, murine retinal pigment epithelium isolation and culture, siRNA and transient DNA transfection, confocal microscopy and confocal quantitative image cytometer, immunocytochemistry/immunofluorescence, flow cytometry

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, QC
Summer Student; Supervisor : Dr. Huy Ong

May 2017-August 2017

The effects of azapeptide ligands of CD36 on the immunometabolic reprogramming of macrophages

- Selective ligands of CD36 have been shown to have a modulatory effect on inflammation elicited by macrophages. We proposed that our azapeptide ligands of CD36 can induce a metabolic shift of macrophages, leading to a change in their inflammatory phenotype.
- Techniques : Western Blot, ELISA, bone marrow-derived macrophages isolation and culture, peritoneal macrophages isolation

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, QC
Summer Student; Supervisor : Dr. Huy Ong

May 2016-March 2017

Mechanism of action of CD36 ligands in modulating the inflammatory response of macrophages

- Selective ligands of CD36 can modulate inflammation in chronic diseases such as atherosclerosis. The objective of this study was to characterize the signaling pathway implicated in the modulatory effect of azapeptide ligands of CD36 on inflammation.
- Techniques : Western Blot, ELISA, bone marrow-derived macrophages isolation and culture

Department of Pharmacology and Therapeutics,
McGill University, Montreal, QC
Pharmacology Honours project; Supervisor: Dr. Bernard Robaire

May 2014-April 2015

Effects of *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and the replacement plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH) on Sprague-Dawley rat epididymal function.

- Phthalates are high production volume chemicals that are commonly used as plasticizers. Some phthalates, such as DEHP, are known endocrine disruptors. The objectives of this study were to determine if *in utero* and lactational exposure to phthalates alters epididymal development, and to compare the effect of a new plasticizer, DINCH, with that of DEHP.
- Techniques: histology (tissue preparation, histological sectioning, staining, microscopy and morphometrical analysis, immunohistochemistry)

PUBLICATION

Mellal K, Omri S, Mulumba M, Tahiri H, Fortin C, Dorion M-F, Pham H, Garcia Ramos Y, Zhang J, Pundir S, Joyal J-S, Bouchard J-F, Sennlaub F, Febbraio M, Hardy P, Gravel S-P, Marleau S, Lubell W D, Chemtob S, and Ong H. Immunometabolic modulation of retinal inflammation by the CD36 ligand MPE-001. *Submitted for publication*

PRESENTATIONS

2019 Marie-France Dorion, Shuya Kasai, Mukundila Mulumba, William D. Lubell, Ken Itoh and Huy Ong. The CD36 ligand azapeptide MPE-001 protects the retinal pigment epithelium from induced oxidative stress. Poster presentation at the 21st International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Paris, France on June 20-21, 2019.

2018 Marie-France Dorion, Mukundila Mulumba, William D. Lubell, Ken Itoh and Huy Ong. The antioxidant effect of the CD36 ligand MPE-001 in the cytoprotection of retinal pigment epithelium. Poster presented at the Rendez-vous de la recherche pharmaceutique, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, in Montreal on December 6th 2018.

Marie-France Dorion. The antioxidant effect of the CD36 ligand MPE-001 in the context of age-related macular degeneration. Oral presentation given at the graduate student seminar day at the Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, in Montreal on November 20th 2018.

Marie-France Dorion, Mukundila Mulumba, William D. Lubell, Ken Itoh and Huy Ong. The antioxidant effect of the CD36 ligand MPE-001 in the cytoprotection of retinal pigment epithelium. Poster presented at the annual conference of Réseau québécois de recherche sur le médicament (RQRM) 2018, in Montreal on October 19th 2018.

Marie-France Dorion, Katia Mellal and Huy Ong. Effect of the CD36 ligand MPE-001 in macrophages immunometabolism. Poster presented at the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Summer Program 2018 poster presentation session in Hayama on June 15th 2018.

Katia Mellal, Samy Omri, Houda Tahiri, Marie-France Dorion, Jinqiang Zhang, Sylvie Marleau, William D Lubell, Sylvain Chemtob, Huy Ong. Azapeptide MPE-001, a CD36 ligand protects against photoreceptors degeneration in TLR2-mediated retinal inflammation. Poster presented at Toll 2018, in Porto on June 7th 2018.

- 2017 Katia Mellal, Samy Omri, Marie-France Dorion, Mukandila Mulumba, Yesica G. Ramos, Sylvie Marleau, William D. Lubell, Sylvain Chemtob and Huy Ong. Modulation de l'inflammation sous-rétinienne par le MPE-001 comme ligand du récepteur CD36 dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Poster presented at the Rendez-vous de la recherche pharmaceutique, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, in Montreal on December 7th 2017.

Katia Mellal, Samy Omri, Marie-France Dorion, Mukandila Mulumba, Yesica G. Ramos, Sylvie Marleau, William D. Lubell, Sylvain Chemtob and Huy Ong. CD36 ligand azapeptide MPE-001, a modulator of subretinal inflammation as a potential treatment of age-related macular degeneration. Poster presented at the annual conference of Réseau québécois de recherche sur le médicament (RQRM) 2017, in Quebec on September 30th 2017.

Katia Mellal, Samy Omri, Marie-France Dorion, Mukandila Mulumba, Yesica G. Ramos, Sylvie Marleau, William D. Lubell, Sylvain Chemtob and Huy Ong. Scavenger receptor CD36 as a target for the treatment of age-related macular degeneration. Poster presented at the annual Canadian Society for Pharmaceutical Sciences (CSPS) Symposium 2017, in Montréal on May 11th 2017.

- 2016 Katia Mellal, Samy Omri, Marie-France Dorion, Mukandila Mulumba, Yesica G. Ramos, Sylvie Marleau, William D. Lubell, Sylvain Chemtob and Huy Ong. Le scavenger récepteur CD36 dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Poster presented at the Rendez-vous de la recherche pharmaceutique, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, in Montreal on December 1st 2016.

* GSK/CSPS Undergraduate Student Awards

Katia Mellal, Samy Omri, Marie-France Dorion, Mukandila Mulumba, Yesica G. Ramos, Sylvie Marleau, William D. Lubell, Sylvain Chemtob and Huy Ong. Scavenger receptor CD36 as a target for the treatment of age-related macular degeneration. Poster presented at the 58th annual meeting of Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ), in Lac Delage on October 1st 2016.

AWARDS AND SCHOLARSHIPS

Master's training scholarship Fonds de recherche du Québec - Santé	<i>May 2019-Ongoing</i>
Michael Smith Foreign Study Supplements Canadian Institutes of Health Research	<i>Dec. 2018</i>
Famille Auclair Scholarship Université de Montréal, Montreal, QC	<i>Oct. 2018</i>
Mitacs-JSPS Summer Program 2018 Mitacs Globalink and Japan Society for the Promotion of Science	<i>June 2018</i>
Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship - Master's Canadian Institutes of Health Research	<i>May 2018-April 2019</i>
Recruitment scholarship Université de Montréal, Montreal, QC	<i>Sept. 2017-April 2018</i>

Research scholarship – Faculty of Pharmacy/Research supervisor Université de Montréal, Montréal, QC	<i>April 2017</i>
GSK/CSPS Undergraduate Student Awards Université de Montréal, Montreal, QC	<i>Dec. 2016</i>
Research scholarship – Faculty of Pharmacy/Research supervisor Université de Montréal, Montreal, QC	<i>April 2016</i>
First Class Honours in Pharmacology McGill University, Montreal, QC	<i>May 2015</i>
Anna and Robert Skomoroski Prize in Science McGill University, Montreal, QC	<i>May 2015</i>
Dean's Honour List McGill University, Montreal, QC	<i>July 2014</i>
Women Associates of McGill Scholarship McGill University, Montreal, QC	<i>July 2014</i>
Dean's Honour List McGill University, Montreal, QC	<i>July 2013</i>
Emily Ross Crawford Scholarship McGill University, Montreal, QC	<i>July 2013</i>
Alma Mater Scholarship McGill University, Montreal, QC	<i>July 2012</i>

OTHER ACTIVITIES

Globalink mentor for international students Mitacs Globalink	<i>April 2019-ongoing</i>
Research study abroad (advisor: Dr. Itoh Ken) Department of Stress Response Science, Graduate School of Medicine, Hirosaki University, Hirosaki * Michael Smith Foreign Study Supplements	<i>Dec. 2018-Feb. 2019</i>
Research study abroad (advisor: Dr. Itoh Ken) Department of Stress Response Science, Graduate School of Medicine, Hirosaki University, Hirosaki * Mitacs-JSPS Summer Program 2018	<i>June 2018-August 2018</i>
Teaching assistant for PHA1320 Laboratoire – Pratique professionnelle 2 Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal	<i>Winter 2018</i>
Member of the pharmacy graduate student council – representative to the research committee Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal	<i>Sept. 2017-May 2018</i>